

Université de Montréal

Entrée des rétrovirus humains : caractérisation moléculaire de la neuropiline-1,
co-facteur à l'entrée de HTLV-1, et inhibition d'entrée du VIH-1 par CCR5

Par Sébastien Janvier

Département de biochimie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en biochimie

18 décembre 2006

© Sébastien Janvier (2006)



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Entrée des rétrovirus humains : caractérisation moléculaire de la neuropiline-1, co-
facteur à l'entrée de HTLV-1, et inhibition d'entrée du VIH-1 par CCR5

Présenté par :
Sébastien Janvier

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Luc Desgroseillers
.....
Président-rapporteur

Dr Nikolaus Heveker
.....
Directeur de recherche

Dr Carolina Alfieri
.....
Membre du jury

RÉSUMÉ

L'entrée des rétrovirus humains dans une cellule hôte est une cible thérapeutique très intéressante. À ce jour, un seul composé ciblant la fusion du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est utilisé comme agent thérapeutique. Différentes molécules ciblant les corécepteurs du VIH-1 sont présentement en essai clinique. Ces études semblent démontrer qu'une telle approche est efficace et sûre. Elle pourrait d'ailleurs être utilisée pour le développement de molécules bloquant l'infection par le virus de la leucémie des lymphocyte T de type 1 (HTLV-1). Dans notre étude, nos objectifs étaient 1) de caractériser la neuropiline-1, co-facteur à l'entrée de HTLV-1, et 2) d'étudier l'activité antivirale de sept molécules lors de l'entrée du VIH-1 par le corécepteur CCR5.

Nous avons d'abord démontré que l'expression de NRP1 à la surface de cellules cibles favorisait l'infection de celles-ci par des pseudotypes portant l'enveloppe de HTLV-2, et par extrapolation, de HTLV-1. Des mutants de délétion de NRP1 ont ensuite été construits et utilisés dans une étude de co-immunoprécipitation où nous regardions l'interaction entre ces mutants et la protéine virale de surface (SU). Nos résultats montrent que tous nos mutants interagissent avec la protéine SU.

Nous avons ensuite testé le pouvoir antiviral de sept molécules agissant comme des antagonistes de CCR5. Nous étions à la recherche d'une molécule pouvant inhiber l'infection du VIH-1 en ciblant sélectivement le corécepteur CCR5, tout en étant non toxique pour les cellules. La molécule 693 a répondu à ces critères.

Mots-clés : entrée virale, HTLV-1, neuropiline-1, pseudotypes, VIH-1, inhibiteurs d'entrées, corécepteur CCR5.

ABSTRACT

Human retrovirus entry is a very promising drug target. Until now, only one molecule that targets HIV-1 fusion, Enfuvirtide (T20), has been approved for treatment. Several molecules targeting HIV-1 coreceptors, currently in clinical trials, showed that it is possible to block efficiently HIV-1 entry. This approach could be used in order to develop the first HTLV-1 drug. Our objectives were 1) to characterize HTLV-1 entry cofactor, neuropilin-1 (NRP1), and 2) to test the antiviral activity of seven compounds in HIV-1 entry via CCR5.

First, we showed that NRP1, a ubiquitous single spanning transmembrane protein, facilitates HTLV-2 pseudotype particles, and by extrapolation, HTLV-1 entry into target cells. We then tried to identify the NRP1 extracellular domain responsible for the interaction with the HTLV-1 surface protein (SU). We created deletion mutants for several sub-domains of the soluble receptor that we used in a coimmunoprecipitation experiment. Our results showed that all the mutants can interact with the viral protein SU.

Second, we investigated the antiviral activity against HIV-1 entry of seven molecules identified as CCR5 antagonists. We produced dual tropic HIV-1_{89.6} particles and infected reporter cell lines expressing either CCR5 or CXCR4. One compound, 693, showed a selective antiviral activity against CCR5-mediated entry.

Keywords : HTLV-1, neuropilin-1, entry cofactor, coreceptor, CCR5, HIV-1, viral entry, entry inhibitor, pseudotype

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
REMERCIEMENTS	xiii

1. INTRODUCTION	1
1.1 VIROLOGIE MOLÉCULAIRE DES RÉTROVIRUS HUMAINS	2
1.1.1 Protéines et génome des rétrovirus	2
1.1.2 Cycle de réplication des rétrovirus humains	4
1.2. ÉPIDÉMIOLOGIE ET ÉTIOLOGIE DES RÉTROVIRUS HTLV-1 ET VIH-1	5
1.2.1 Épidémiologie de HTLV-1	5
1.2.2 Étiologie de HTLV-1	6
1.2.3 Épidémiologie du VIH-1 et syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA)	9
1.3 ENTRÉE DES VIRUS ENVELOPPÉS	11
1.3.1 Attachement : Interaction virus/cellule cible	11
1.3.1.1 DC-SIGN	11
1.3.1.2 Heparan sulfate proteoglycan	13
1.3.2 Protéines d'enveloppe virale et récepteurs d'entrée	14
1.3.3 Entrée virale par multiples récepteurs	15
1.3.4 Transmission par contact cellule-cellule : synapse virologique	17
1.4 ENTRÉE DU VIRUS DE LA LEUCÉMIE DES LYMPHOCYTES T HUMAIN DE TYPE 1 (HTLV-1)	18
1.4.1 Entrée virale de HTLV-1	19
1.4.2 Récepteurs d'entrée de HTLV-1	19
1.4.2.1 GLUT-1	20
1.4.2.2 Neuropiline-1	21
1.5 ENTRÉE DU VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1 (VIH-1)	24
1.5.1 Récepteur d'entrée CD4	25
1.5.2 Corécepteurs CXCR4 et CCR5	26

1.5.2.1 CXCR4	26
1.5.2.2 CCR5	27
1.5.3 Tropisme et évolution pathologique	30
1.6 ENTRÉE DES RÉTROVIRUS COMME CIBLE THÉRAPEUTIQUE	31
1.6.1 Détails moléculaires	32
1.6.2 Inhibiteurs d'entrée ciblant le récepteur du VIH-1	33
1.6.3 Inhibiteurs d'entrée ciblant les corécepteurs du VIH-1	34
1.7 MODÈLES EXPÉRIMENTAUX <i>IN VITRO</i> POUR L'ÉTUDE DE L'ENTRÉE DES RÉTROVIRUS	36
1.7.1 Modèles cellulaires rapporteurs	36
1.7.2 Pseudotypes viraux	37
1.8 BUT DE L'ÉTUDE	39
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	40
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION SUR LA CARACTÉRISATION DU DOMAINE D'INTERACTION ENTRE LA NEUROPILINE-1 ET HTLV-1 SU.	51
3.1 L'EXPRESSION DE NRP1 À LA SURFACE CELLULAIRE FAVORISE L'ENTRÉE DE PSEUDOTYPES HTLV-2	53
3.2 CONSTRUCTION DES MUTANTS DE LA NEUROPILINE-1 DE TYPE SAUVAGE (NRP1) ET SOLUBLE (SNRP1).	55
3.3 DÉTECTION DES MUTANTS DE NRP1 À LA SURFACE CELLULAIRE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX	57
3.4 CARACTÉRISATION DES MUTANTS DE SNRP1 PAR IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN	59
3.5 SNRP1 ET LES MUTANTS INTERAGISSENT AVEC LA PROTÉINE D'ENVELOPPE SU DE HTLV-1 DANS LA VOIE DE SÉCRÉTION	62
3.6 DISCUSSION	66

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION SUR L'INHIBITION SÉLECTIVE DE L'ENTRÉE DU VIH-1 PAR LE CORÉCEPTEUR CCR5	72
4.1 INHIBITION DE L'ENTRÉE DU VIH-1 EN CIBLANT SÉLECTIVEMENT LE CORÉCEPTEUR CCR5	74
4.2 DISCUSSION	81
5. CONCLUSION	86
6. BIBLIOGRAPHIE	88
7. ANNEXE	112
CONTRIBUTIONS	113

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Représentation schématique des rétrovirus humains	3
Figure 1.2	Cycle de réplication des rétrovirus	4
Figure 1.3	Évolution de la charge virale et du système immunitaire	10
Figure 1.4	Implication de DC-SIGN lors de l'infection par le VIH-1	13
Figure 1.5	Entrée du VIH-1 par récepteurs multiples	16
Figure 1.6	Transmission par contact cellule-cellule : synapse virologique	18
Figure 1.7	Schéma représentant la neuropiline-1 (NRP1)	22
Figure 1.8	L'interaction entre CD4 et gp120 libère la boucle V3	24
Figure 1.9	<i>ccr5Δ32</i>	30
Figure 1.10	Différentes cibles des souches X4 et R5 tropiques	31
Figure 1.11	Effet des divers ligands sur l'activation des récepteurs cellulaires	33
Figure 2.1	Schéma de la mutagenèse dirigée pour les mutants Δa1 et Δa2	43
Figure 2.2	Schéma de la mutagenèse dirigée pour les mutants Δa, Δb et Δc	44
Figure 2.3	Schéma du clonage du domaine TM dans le vecteur pSecTagA-sNRP1	45
Figure 3.1	NRP1 est impliquée lors de l'entrée des pseudotypes HTLV-2	54
Figure 3.2	Schéma des différents mutants NRP1	56
Figure 3.3	Expression à la surface cellulaire de NRP1 et des mutants Δa1, Δa2, Δa et Δb.	58
Figure 3.4	Caractérisation des mutants Δa, Δa1, Δa2, Δb et Δc de sNRP1 par immunobuvardage de type Western	61
Figure 3.5	sNRP1 et les mutants forment des complexes intracellulaires avec la protéine SU de HTLV-1	65
Figure 4.1	Inhibition sélective et dose-dépendante de l'infection du VIH-1 _{89.6} par les composés TAK799 et TC14012	75

Figure 4.2	Inhibition de l'infection du VIH-1 _{89.6} par les molécules du thé vert	77
Figure 4.3	Inhibition de l'infection du VIH-1 _{89.6} par les composés RK2, 446, 699 et 693	80

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
A-MLV	Amphotropic-murin leukemia virus
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
siARN	Small interfering acide ribonucléique
ATL	Adult T-cell leukemia/lymphoma
BLV	Bovine leukemia virus
CA	Capside
CADA	Cyclotriazadisulfonamide
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CMV	Cytomegalovirus
CPRG	Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside
C-terminale	Carboxy-terminale
DC-SIGN	Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EGCG	Epigallocatechin gallate
E-MLV	Ecotropic-murin leukemia virus
ENV	Enveloppe
FGF	Fibroblast growth factor
FIV	Feline immunodeficiency virus
GALV	Gibbon-ape leukemia virus
gp	Glycoprotéine
HA	Hémagglutinine
HAM/TSP	HTLV-associated myelopathy/Tropical spastic paraparesis
HEK	Human embryonic kidney
HTLV	Human T-cell leukemia virus
HSPG	Heparan sulfate proteoglycan
HSV	Herpes simplex virus
HVEM	Herpes simplex virus entry mediator

IC ₅₀	50% inhibitory concentration
INT	Intégrase
LDL	Low density lipoprotein
LTR	Long terminal repeat
Lys	Lysine
MA	Matrice
MAM	Meprin, A5, μ -phosphatase
MCP	Macrophage/monocyte chemotactic protein
MLV	Murine leukemia virus
MIP-1	Macrophage inflammatory protein 1
MTOC	Microtubules organising center
NC	Nucléocapside
NK	Natural killer cell
NRP1	Neuropiline-1
sNRP1	Neuropiline-1 soluble
NRP2	Neuropiline-2
N-terminale	Amino-terminale
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate saline buffer
PEI	Polyéthylénimine
Phe	Phénylalanine
PlGF	Placental growth factor
PRO	Protéase
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
RT	Transcriptase inverse
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SEMA-3A	Semaphorin 3A
SIDA	Syndrôme d'immunodéficience acquise
SIH	Simian immunodeficiency virus

SU	Protéine de surface
SVF	Sérum de veau fœtal
Tat	Transactivator of transcription
TGF	Transforming growth factor
TM	Transmembranaire
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VSV	Vesicular stomatitis virus
VZV	Varicella zoster virus

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Nikolaus Heveker, pour le soutien académique, technique et moral. Il fut en grande partie le forgeron de ma pensée scientifique critique.

J'aimerais remercier deux rayons de soleil, Isabelle Slight et Yamina A. Berchiche. D'abord collègues, elles ont été d'une patience exemplaire, avec quelqu'un qui comprend vite mais à qui il faut expliquer longtemps. Elles devinrent par la suite des amies-psychologues-humoristes-cuisinières-astrologues. Que demander de plus!

Merci beaucoup aux gens qui, de près ou de loin, ont contribué à ma formation, en particulier Claudine Pique, Michel Bouvier et Fadi Hamdan. J'aimerais également remercier ma correctrice officielle, Mélanie Cyr-Morin.

Je garde mes derniers mots pour les deux femmes de ma vie, ma mère Hélène et ma sœur Caroline. Sans elles, je ne serais sûrement pas où j'en suis. Elles ont été ma source d'inspiration, mes muses. Maman, soeurette, je vous aime.

Je ne pourrais passer sous silence l'appui inconditionnel de mon père, Pierre. Les encouragements venant d'en haut sont sans aucun doute les plus puissants. P'tit bonhomme, il me disait toujours : « Donnes-moi un point d'appui, et je soulèverai la terre ». Je sais que cette citation est de lui...

1. INTRODUCTION

1.1 VIROLOGIE MOLÉCULAIRE DES RÉTROVIRUS HUMAINS

Les rétrovirus humains font partie de la famille des rétrovirus complexes. Le génome des rétrovirus complexes encode pour les protéines de structure et enzymes Gag/Pol/Pro/Env, ainsi que pour des protéines auxiliaires essentielles au contrôle de leur cycle de réplication *in vivo*. Les rétrovirus qui infectent les vertébrés sont classés en 6 genres dont 2 comptent les rétrovirus humains. Les virus de l'immunodéficience humaine de type 1 et 2 (VIH-1 et VIH-2) sont classés parmi les lentivirus, genre dans lequel on retrouve également les virus d'immunodéficience féline (FIV) et simien (SIV). Les autres rétrovirus humains, les virus de la leucémie des lymphocytes T de type 1, 2 et 3 (HTLV-1, HTLV-2 et HTLV-3) se retrouvent chez les deltaviruses où l'on retrouve également le virus de la leucémie bovine (BLV). Cet ouvrage portera sur HTLV-1 et VIH-1 en ciblant particulièrement le processus d'entrée virale.

1.1.1 PROTÉINES ET GÉNOME DES RÉTROVIRUS

Les rétrovirus sont formés d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées les protéines transmembranaires (TM) et les protéines de surface (SU) (**Figure 1.1**). On retrouve sous cette bicouche lipidique la matrice (MA) qui a pour fonction principale le recrutement de la polyprotéine Gag au site de formation des particules virales. La capside (CA) forme une structure dans laquelle on retrouve le génome viral lié par la nucléocapside (NC), qui préserve l'intégrité de l'ARN viral. La protéase (PRO), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (INT) sont également retrouvées dans le virion.

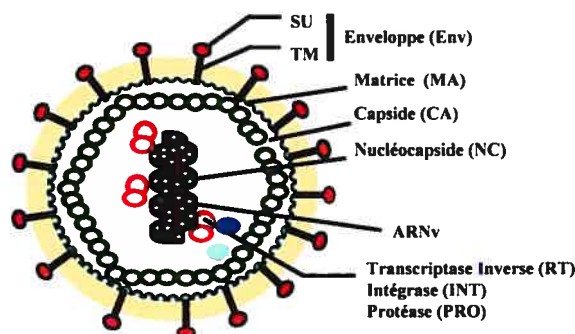
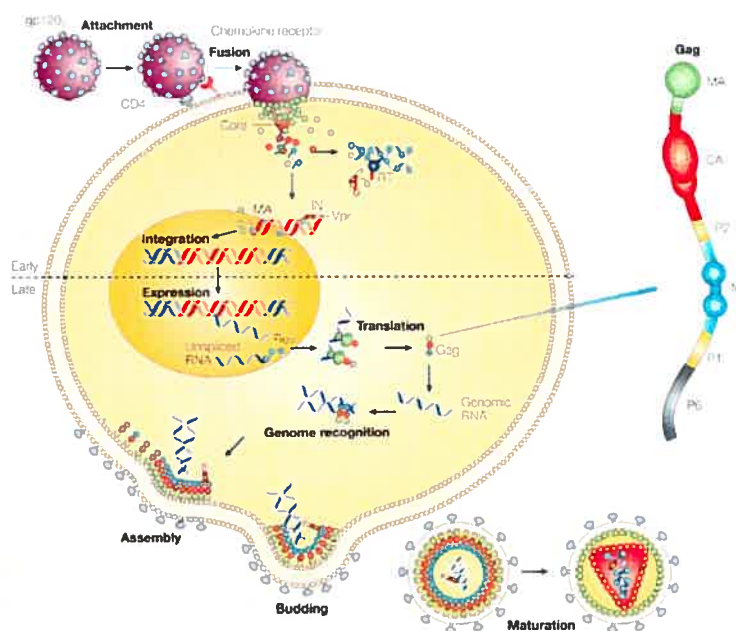


Figure 1.1 Représentation schématique des rétrovirus humains. Les rétrovirus sont enveloppés d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées les protéines d'enveloppe TM et SU. On retrouve à l'intérieur de la particule virale la matrice (MA), la capside (CA), la nucléocapside (NC), la transcriptase inverse (RT), l'intégrase (INT), la protéase (PRO) et l'ARN génomique viral (ARNv).

Les rétrovirus humains possèdent un génome viral sous forme d'ARN simple brin qui, une fois rétrotranscrit en ADN double brin (provirus), est intégré au génome de la cellule infectée. Il est composé d'environ 9000 bases et est flanqué de longues séquences répétées (LTR; Long Terminal Repeat). Ces séquences contiennent le promoteur viral ainsi que la séquence d'encapsidation Ψ . La transcription des ARN messagers (ARNm) codant pour Gag, Pol et Pro diffère d'un rétrovirus à l'autre. Dans le cas de HTLV-1, l'ARNm codant pour Gag est produit directement pour former le précurseur 55kDa (Pr55). Un changement de cadre de lecture programmé (« frameshift ») à la fin du gène *gag* permet de synthétiser l'ARNm *gag/pro* (Pr70). La synthèse de l'ARNm *gag/pro/pol* (Pr160) nécessite un deuxième changement de cadre de lecture. Les ARNm des gènes *env*, *tax/rex* et *tof/rof* sont produits suite à l'épissage séquentiel de l'ARN génomique viral. Contrairement à HTLV-1, le VIH-1 n'a besoin que d'un seul changement de cadre de lecture pour produire le précurseur *gag/pol* puisque *pro* se situe dans le même cadre de lecture que *pol* et *int*. Les protéines d'enveloppe et les protéines auxiliaires du VIH-1 sont également obtenues suite à l'épissage de l'ARN génomique viral.

1.1.2 CYCLE DE RÉPLICATION DES RÉTROVIRUS HUMAINS

La première étape du cycle de réplication des rétrovirus humains est l'entrée dans la cellule cible (**Figure 1.2**). Cette étape est d'ailleurs le point d'intérêt de cet ouvrage. Elle mène à la fusion entre les membranes virale et cellulaire, larguant dans la cellule la capside. Cette dernière est ensuite dégradée pour libérer le génome viral ainsi que les enzymes qui furent encapsidés lors du bourgeonnement dans la cellule productrice. La transcriptase inverse procède alors à la production du provirus auquel se lie l'intégrase et la nucléocapside pour former le complexe de préintégration.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Figure 1.2 Cycle de réplication des rétrovirus humains. La première étape du cycle de réplication des rétrovirus humains est l'entrée dans une cellule cible. Vient ensuite la rétrotranscription du génome viral et l'intégration. Les protéines virales sont ensuite produites sous forme de précurseurs. Finalement, le virion bourgeonne à la membrane cellulaire et la protéase permet la maturation de celui-ci. Cette figure représente le cycle de réplication du VIH-1. Tiré de D'Souza V. et Summer M.F. (1).

Le VIH-1 possède la protéine Vpr qui permet la translocation du complexe de préintégration à travers la membrane nucléaire (2). Cette caractéristique importante permet au VIH-1 d'infecter les cellules différenciées (macrophages, cellules microgliales, cellules dendritiques) ou les cellules en arrêt de division (lymphocytes T mémoires ou naïves). Le complexe de préintégration du HTLV-1 quant à lui doit attendre une division cellulaire afin de pouvoir atteindre le génome de l'hôte puisque aucune protéine virale ne permet son transport à travers les pores nucléaires. Une fois intégré, le génome viral est transcrit à l'aide des protéines cellulaires pour produire les différents ARNm ainsi que l'ARN génomique. Les précurseurs protéiques sont transportés à la surface cellulaire où ils rejoignent les protéines d'enveloppe SU et TM. Il y a ensuite bourgeonnement de la particule virale et maturation des différents précurseurs pour former un virion infectieux.

1.2. ÉPIDÉMIOLOGIE ET ÉTIOLOGIE DES RÉTROVIRUS HTLV-1 ET VIH-1

1.2.1 ÉPIDÉMIOLOGIE DE HTLV-1

La population mondiale vivant avec HTLV-1 est estimée à 10-20 millions de personnes. Le virus n'est pas distribué également sur le globe, ciblant plutôt certaines régions où il est endémique. Des études populationnelles ont démontré que 3-6% de la population de Trinidad, de la Jamaïque et des autres îles des Caraïbes était séropositif pour le virus (3, 4). La prévalence de HTLV-1 sur le territoire Africain démontre quant à elle un gradient du Nord vers l'Afrique équatoriale (5). Le Japon est le pays le plus durement touché. Une étude nationale a identifié 7 régions où HTLV-1 était endémique (6). Six d'entre elles sont situées au Sud-Ouest du pays. Dans la région rurale de Miyazaki, la prévalence est évaluée à plus de 3 personnes sur 10 (7). La Mélanésie, la Papua Nouvelle-Guinée, les Îles Solomon et certaines régions d'Amérique du Sud sont également considérées comme des régions endémiques.

Au Canada, les premiers cas de patients porteurs du virus furent rapportés en 1989 (8). Entre 1990 et 2000, on comptait une séroprévalence de 0,002% chez les donneurs de sang (9). Une région endémique est retrouvée chez les Natifs Côtiers de la Colombie-Britannique où l'on note une séroprévalence de 0,5-4% (10). Récemment, un premier cas de décès associé à HTLV-1 fut également répertorié au Nunavut (11).

HTLV-1 se transmet par contacts sexuels (voie horizontale), transfusions sanguines ou usage de drogues intraveineuses (voie parentale), ou de la mère à l'enfant à travers le lait maternel (voie verticale). La transmission intra-utérine est négligeable (12). Dans la grande majorité des cas, le virus est transmis par le transfert de lymphocytes T infectés. Le mode de transmission contribuerait de façon significative à la pathologie développée par un patient séropositif. La transmission par contact sanguin favoriserait le développement de « HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis » (HAM/TSP) (13) et le contact sexuel, ou la transmission par le lait maternel, favoriseraient le développement de l'« Adult T-cell leukemia/lymphoma » (ATL) (14).

1.2.2 ÉTIOLOGIE DE HTLV-1

Un groupe de chercheurs japonais caractérisa pour la première fois en 1977 une nouvelle forme de leucémie des lymphocytes T que l'on retrouvait chez les adultes exclusivement (15). Ils nommèrent cette nouvelle pathologie « Adult T-cell leukemia/lymphoma » ou ATL. Quelques années plus tard, un agent étiologique rétroviral lui fut associé : « Human T-cell Leukemia Virus » (HTLV). Une deuxième pathologie neuro-dégénérative lui fut par la suite associée : « HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis » (HAM/TSP) (16, 17). Les études épidémiologiques subséquentes ont montré un fait intrigant : seulement 5% des personnes séropositives pour HTLV-1 vont développer l'une ou l'autre de ces maladies (ou même les deux à la fois). Après 25 ans de recherche sur

ce virus, aucun vaccin ni agents antirétroviraux n'ont été développés et aucun traitement ne permet de guérir l'une ou l'autre de ces deux maladies.

La leucémie des lymphocytes T chez l'adulte (ATL) est un lymphome de lymphocytes T CD4⁺/CD25⁺ en circulation (15). Il s'agit d'une prolifération monoclonale de ces lymphocytes T CD4⁺ activés. Une période de latence clinique (mesurée en nombre d'années) s'installe suivant l'infection. Comparativement à d'autres infections, la charge virale n'est pas un indicateur fiable de l'évolution de la maladie puisqu'elle est variable entre les patients séropositifs pour HTLV-1. Malheureusement, aucun traitement ne permet de guérir les patients une fois que l'ATL se développe. Leur espérance de vie varie de 3 à 12 mois. Cette pathologie est habituellement traitée à l'aide de combinaisons agressives de traitements chimiothérapeutiques. Le facteur de risque majeur pour le développement de cette maladie est la transmission du virus à travers le lait maternel. Le transactivateur transcriptionnel viral Tax serait responsable de la transformation et de l'immortalisation des cellules infectées. Tax induit l'expression de gènes critiques dans la croissance et la prolifération des lymphocytes T (18-24).

En 1985, l'équipe du Dr Gessain associait pour la première fois HTLV-1 à une pathologie autre que l'ATL (17). Il s'agissait de patients de la Martinique souffrant de paraparésie spastique tropicale (TSP; Tropical Spastic Paraparesis), une maladie qui s'apparente à la sclérose en plaque. Dans cette cohorte de 17 patients, 10 possédaient des anticorps dirigés contre HTLV-1. L'année suivante, un groupe de chercheurs japonais associait HTLV-1 à des symptômes similaires chez leurs patients (16). Ils nommèrent cette nouvelle pathologie la myélopathie associée à HTLV-1 (HAM; HTLV-1-Associated Myelopathy), nom qui fut ensuite ajouté au premier par consensus. Aucun traitement n'a eu de succès dans la guérison de cette maladie.

Comme pour l'ATL, seulement 5% des porteurs de HTLV-1 développeront cette maladie, les femmes étant majoritairement touchées (25, 26). La période

d'incubation est mesurée en nombre d'années (27). Les signes cliniques les plus importants sont sensiblement les mêmes que ceux pour la sclérose en plaque : faiblesse au niveau des membres inférieurs et spasticité des jambes (28).

Deux acteurs seraient en cause dans le développement de l'HAM/TSP. Les premiers sont les lymphocytes T CD4+ infectés et les lymphocytes T CD8+ activés ciblant HTLV-1 qui passent à travers la barrière hématoencéphalique provoquant ainsi une réponse immunitaire locale (29). Une fois logées au sein du système nerveux central, ces cellules deviendront à leur tour la cible des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (30). Les deuxièmes acteurs sont les anticorps dirigés contre la protéine Tax qui reconnaissent, par mimétisme moléculaire, un auto-antigène de 33kDa exprimé dans les cellules du système nerveux central (31). Cette réaction croisée aurait pour effet de générer une réaction immunitaire inflammatoire et cellulaire provoquant la démyélinisation des neurones du système nerveux central conduisant au développement de la maladie. D'autres maladies inflammatoires furent également associées à HTLV-1, comme la polymyosie (32, 33) ou l'uvéite (34, 35).

L'infection par HTLV-1 des lymphocytes T et autres cellules du système immunitaire mène également à la chute du nombre de cellules effectrices conduisant à une certaine immunodéficience. Cette immunodéficience peut être causée en partie par la transformation des lymphocytes T CD4+ les rendant ainsi inactifs au sein de la réponse immunitaire cellulaire. En plus de lutter contre l'ATL, l'HAM/TSP et les autres maladies inflammatoires, les patients doivent également faire face aux infections opportunistes causées par divers microorganismes tels *Pneumocystis carinii*, cytomégalovirus, *Strongyloidiasis* et plusieurs fungies (12).

1.2.3 ÉPIDÉMIOLOGIE DU VIH-1 ET SYNDROME D'IMMUNODÉFICIENCE ACQUISE (SIDA)

Selon le rapport de l'organisme ONUSIDA pour l'année 2006, environ 38,6 millions de personnes à travers le monde vivent avec le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) (36). Le nombre de nouvelles infections en 2005 s'élève à 4,1 millions. Durant cette même année, environ 2,8 millions de personnes infectées par le VIH-1 en sont décédées. Ce virus, qui touche toutes les régions du globe, est maintenant à l'état de pandémie. La région la plus durement touchée est l'Afrique subsaharienne où l'on compte 24,5 millions d'adultes vivant avec le VIH-1, dont 2,7 millions de nouvelles infections en 2005. La prévalence chez l'adulte dans cette région est de 6,1% et 57% des cas sont des femmes. Au Canada, le nombre de personnes vivant avec le virus est estimé à 60 000. L'accès aux traitements antirétroviraux a permis de limiter à moins de 1000 le nombre de décès en 2006. Depuis sa découverte en 1981, le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) aura tué plus de 25 millions de personnes sur le globe.

Le VIH-1 se transmet par contact sexuel (muqueuse), par partage d'aiguille lors de l'injection de drogues intraveineuse et de la mère au fœtus/enfant. Selon l'OMS, entre 15% et 30% des mères séropositives transmettront le virus à leur enfant pendant la grossesse (à travers le placenta) ou au moment de l'accouchement. 10% à 20% d'entre elles le transmettront à travers le lait maternel. Il est toutefois possible de bloquer presque complètement la transmission du virus en soumettant la femme enceinte à un traitement antirétroviral, à un accouchement par césarienne et en substituant le lait maternel par un lait reconstitué.

Le SIDA correspond à un ensemble de symptômes découlant de la destruction des lymphocytes T CD4+. Le stade SIDA est la phase ultime de la maladie et survient de 2 à 10 ans après l'infection (**Figure 1.3**).

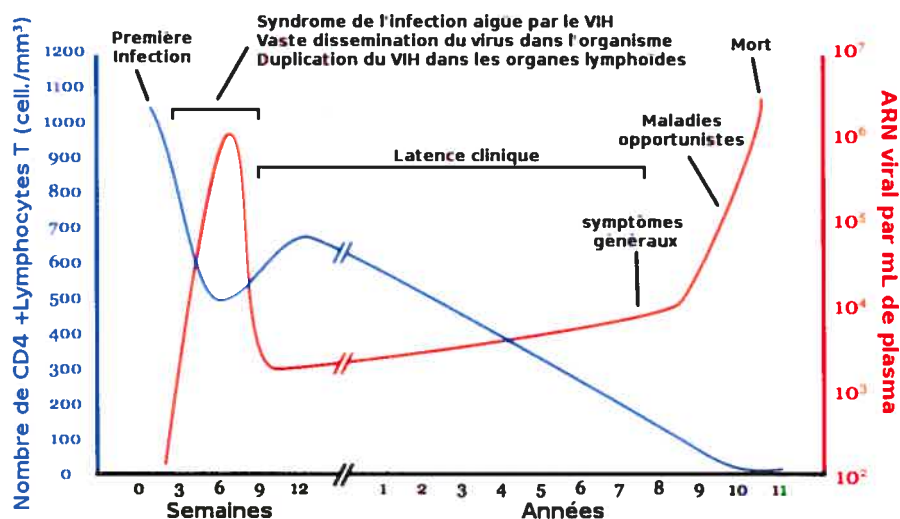


Figure 1.3 Évolution de la charge virale et du système immunitaire. Tiré de Ho DD et al. (37).

Les signes de la primo-infection sont peu spécifiques et pourraient correspondre aux symptômes d'une infection virale comme la grippe. La maladie évolue par la suite avec le développement chez plusieurs patients du zona, signe de la réémergence du VZV contrôlé jusque-là par le système immunitaire. Le troisième stade de la maladie coïncide avec la perte massive de lymphocytes T CD4+ permettant aux micro-organismes opportunistes (comme *Mycobacterium tuberculosis* et *Candida albicans*) de resurgir. L'apparition de lymphomes, du développement de pneumocystose et du syndrome de Kaposi sont des signes du stade avancé du SIDA et mènent au décès du patient séropositif. Il est possible de suivre l'évolution de la maladie à l'aide du compte du nombre de lymphocytes T CD4+ et de la charge virale (ARN viral plasmatique).

1.3 ENTRÉE DES VIRUS ENVELOPPÉS

Les mécanismes d'entrée virale varient grandement d'un type de virus à un autre au sein des virus enveloppés. Certains virus comme le virus de l'influenza doivent être internalisés par endocytose pour qu'il y ait fusion entre les bicouches lipidiques virales et cellulaires (38). Dans ce cas, le pH acide retrouvé dans les endosomes favorise le changement de conformation des protéines d'enveloppe qui mènera ensuite à la fusion. D'autre part, l'entrée des rétrovirus s'effectue à un pH physiologique ne nécessitant pas le passage dans les endosomes pour qu'il y ait fusion (39). Il s'agit d'un processus séquentiel impliquant 3 étapes : l'attachement à la surface cellulaire, l'interaction avec le récepteur/corécepteur et la fusion. Chacune de ces étapes pourrait être la cible d'agents thérapeutiques antirétroviraux.

1.3.1 ATTACHEMENT : INTERACTION VIRUS/CELLULE CIBLE

La première étape de l'entrée des rétrovirus dans une cellule cible est l'attachement du virus à la surface de la cellule. Cette interaction implique des protéines membranaires qui possèdent un domaine extracellulaire important et fortement glycosylé. La protéine « dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin » (DC-SIGN) ainsi que les protéines « herparan sulfate proteoglycan » (HSPG) sont des protéines membranaires qui favorisent l'entrée de plusieurs rétrovirus humains. Elles permettent d'élérer la concentration de virus fixé à la surface cellulaire favorisant ainsi l'interaction entre la protéine d'enveloppe virale et le récepteur d'entrée.

1.3.1.1 DC-SIGN

DC-SIGN, exprimée exclusivement à la surface des cellules dendritiques matures et immatures, médie une forte interaction entre ces cellules et les lymphocytes T. Cette protéine de 404 acides aminés à un domaine

transmembranaire est essentielle à la prolifération des lymphocytes T (40, 41). L'ectodomaine est composé de 7 domaines identiques complets (23 acides aminés), d'un domaine incomplet et d'un domaine lectine de type C (dépendant du calcium). Les domaines lectines interagissent avec les résidus sucrés présents sur les diverses protéines.

DC-SIGN favorise l'interaction entre les cellules dendritiques et les rétrovirus VIH-1, VIH-2 et SIV (40, 42). Il fut alors suggéré que cette protéine pourrait agir comme un facteur d'attachement universel pour les lentivirus de primates. DC-SIGN lie les protéines d'enveloppe virale par son domaine lectine (40, 42). Cette liaison est également dépendante du niveau de glycosylation de l'enveloppe virale (43, 44). La présence de DC-SIGN à la surface des cellules dendritiques n'est pas suffisante pour l'infection. De plus, un niveau élevé d'expression est nécessaire pour la liaison du virus (42). DC-SIGN agit donc comme une protéine d'attachement et non comme un récepteur d'entrée.

L'infection impliquant DC-SIGN peut s'effectuer selon deux modes : en *cis* (infection de la cellule exprimant cette protéine) ou en *trans* (transmission du virus d'une cellule dendritique à une cellule cible) (**Figure 1.4**). La transmission en *cis* exige l'expression du récepteur CD4 et des corécepteurs CXCR4 ou CCR5 à la surface de la cellule dendritique. L'infection en *trans* quant à elle ne nécessite que la présence de DC-SIGN. Le virus est ainsi internalisé (ou non) et présenté à un lymphocyte T CD4⁺ exprimant CXCR4 et/ou CCR5 comme s'il s'agissait d'un antigène.

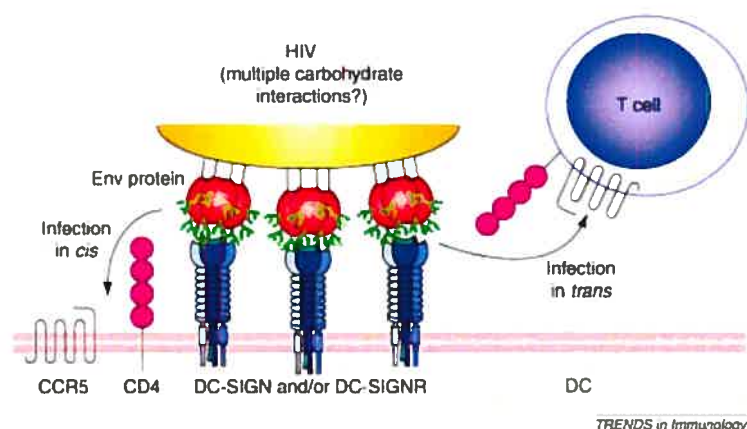


Figure 1.4 Implication de DC-SIGN lors de l'infection par le VIH-1. DC-SIGN permet l'attachement du VIH-1 à la cellule dendritique en liant la protéine d'enveloppe. Le virus peut alors infecter cette cellule (infection *in cis*) ou une autre cellule (infection *in trans*). Modifié de Pöhlmann S et al. (45).

1.3.1.2 HEPARAN SULFATE PROTEOGLYCAN

Les HSPGs forment une classe de molécules composées d'un corps protéique auquel est lié (« O-linked ») une chaîne polysaccharide héparane sulfate. Elles sont exprimées sur une grande variété de cellules de mammifère (46). Les HSPGs incluent la famille de syndecanes transmembranaires, la famille des glypicans ancrés par le phosphatidylinositol et la famille des perlecanes extracellulaires (47, 48). Ces familles de protéines permettent la liaison d'une multitude de médiateurs cellulaires tels les facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs) (49, 50) et les TGF-1 et TGF-2 (51). Elles agissent comme capteur de facteurs solubles augmentant les possibilités d'interaction avec le récepteur spécifique de ces molécules. Ces protéines permettent aussi la prise de lipide dans les hépatocytes et les artères comme voie alternative aux récepteurs de LDL (52).

Les HSPG lient plusieurs virus permettant leur attachement à une cellule cible. Parmi ces virus, on compte certains virus herpes, le virus du papillome humain, le virus dengue et le virus de l'hépatite C (53). Elles permettent également l'attachement des rétrovirus humains HTLV-1 et VIH-1. L'expression des HSPG

permet l'attachement des virions HTLV-1 et médie l'entrée du virus dans les cellules adhérentes (54, 55) et dans les lymphocytes T CD4+ (56). L'élimination des domaines sucrés à la surface cellulaire permet de diminuer la liaison de l'enveloppe virale de HTLV-1 sans toutefois abolir complètement cette interaction. Pour ce qui est du VIH-1, un traitement enzymatique des cellules cibles avec l'héparitinase, un enzyme clivant les résidus sucrés, mène à une diminution de la liaison du VIH-1 à la surface d'une cellule cible ainsi qu'à l'inhibition de l'infection par ce virus (57). Dans chacun de ces cas, l'implication réelle des HSPG dans l'entrée virale n'a pas encore été élucidée. L'interaction entre les HSPGs et l'enveloppe virale serait la première d'une série d'événements conduisant à l'infection d'une cellule cible. Dans ce cas-ci, les HSPGs ne seraient pas nécessaires à l'entrée de HTLV-1 ni du VIH-1 *in vivo*, mais augmenteraient la concentration de virus en surface cellulaire favorisant l'interaction avec les récepteurs d'entrée. Il s'agirait ici d'une relation d'avidité, impliquant les résidus sucrés de l'enveloppe virale et la protéine cellulaire, et non d'affinité.

1.3.2 PROTÉINES D'ENVELOPPE VIRALE ET RÉCEPTEURS D'ENTRÉE

La protéine d'enveloppe des rétrovirus est d'abord traduite sous la forme d'une polyprotéine précurseure (Env) qui est ensuite clivée pour former la protéine de surface (SU), et la protéine transmembranaire (TM) qui est ancrée dans la membrane virale (39). Le précurseur entre dans la voie de sécrétion où il sera d'abord glycosylé dans le réticulum endoplasmique pour ensuite être clivé par les protéases cellulaires générant ainsi les protéines matures SU et TM. L'interaction entre SU et TM est établie par une liaison non-covalente (ponts disulfures). Les protéines d'enveloppe sont alors acheminées à la surface cellulaire où elles seront rejointes par les autres protéines virales. La protéine SU est responsable de l'interaction avec le récepteur de la cellule cible alors que TM permet la fusion entre les enveloppes virale et cellulaire. Les protéines d'enveloppe virale s'assemblent sous la forme d'un hétérotrimère (3 TM et 3 SU).

La majorité des récepteurs d'entrée des rétrovirus oncogènes de mammifères possède plusieurs domaines transmembranaires. Ces récepteurs semblent également être suffisants pour l'entrée. Par exemple, le virus de la leucémie murine écotropique (E-MLV) infecte les cellules cibles via un transporteur d'acides aminés basiques (CAT-1) qui possède 14 domaines transmembranaires (58). Pit-2, un transporteur de phosphate à 10-13 domaines transmembranaires, permet quant à lui l'entrée du rétrovirus Amphotropic-MLV (A-MLV) (59, 60). Toutes ces protéines possèdent des domaines extracellulaires près de la membrane. L'identification des récepteurs des rétrovirus humains semble toutefois contredire cette règle. En effet, le VIH-1 utilise comme récepteur CD4, une protéine à un seul domaine transmembranaire possédant un domaine extracellulaire imposant. L'entrée de ce rétrovirus nécessite également la présence, à la surface cellulaire, des récepteurs de chimiokines CCR5 ou CXCR4. Ces protéines possèdent 7 domaines transmembranaires et un domaine extracellulaire près de la membrane. Les corécepteurs d'entrée du VIH-1 seront discutés au point 1.5.2.

1.3.3 ENTRÉE VIRALE PAR MULTIPLES RÉCEPTEURS

Certains rétrovirus utilisent plus d'un récepteur lors de l'entrée dans une cellule cible. Le récepteur devient alors nécessaire mais pas suffisant à l'entrée virale. Il doit donc y avoir un corécepteur, qui entre en jeu une fois que la protéine virale SU a lié le récepteur. Cette interaction induit un changement de conformation dans la protéine virale libérant le domaine de liaison au corécepteur. Ce domaine est non disponible en absence d'interaction avec le récepteur. La cellule cible doit donc exprimer à la fois le récepteur et le corécepteur, ce qui a pour effet de restreindre le tropisme du virus. Le virus de l'immunodéficience féline (FIV) utilise cette stratégie pour infecter une cellule cible. La protéine d'enveloppe lie d'abord le récepteur fCD134, induisant un changement de conformation dans la protéine virale SU, lui permettant ainsi de lier le corécepteur fCXCR4 (61-63). Chacune de ces protéines est nécessaire, mais pas suffisante

pour l'entrée. Le VIH-1 entre par ce même processus, utilisant CD4 comme récepteur d'entrée et les récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4 comme corécepteurs (**Figure 1.5**).

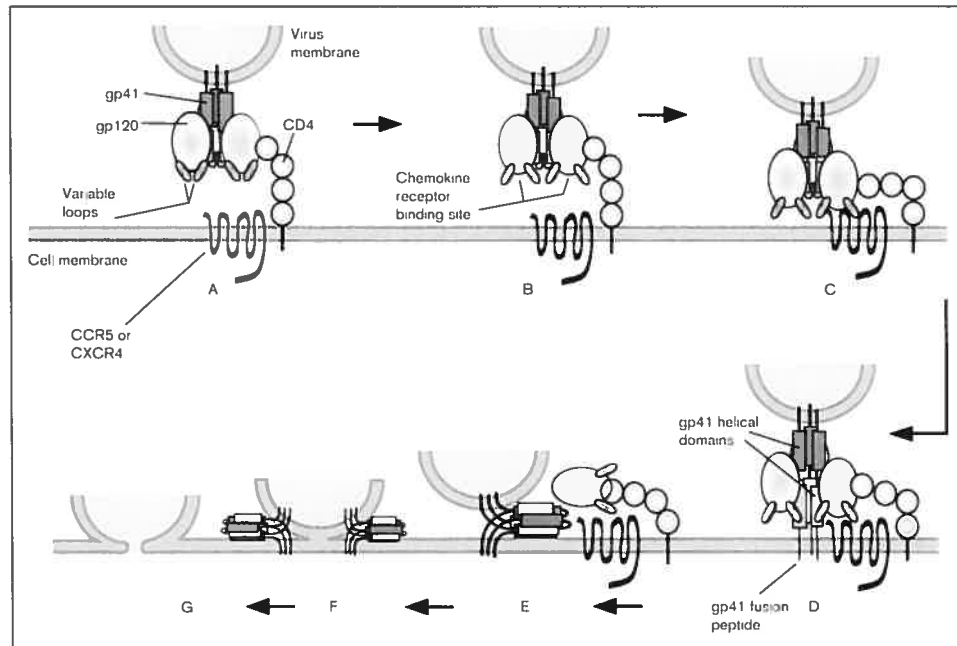


Figure 1.5 Entrée du VIH-1 par récepteurs multiples. L'entrée du VIH-1 est un processus séquentiel. Il y a d'abord interaction entre CD4 et la gp120 du VIH-1 (A), qui induit un changement de conformation, libérant le site d'interaction avec le corécepteur (B). La gp120 lie alors le corécepteur (C) induisant un changement dans la gp41 qui vient s'ancrer dans la membrane cellulaire (D). La gp41 adopte ensuite une structure en épingle à cheveux (E) rapprochant les enveloppes virale et cellulaire (F), qui pourront alors fusionner (G). Tiré de Shaheen F. et Collman R.G. (64).

Récemment, les protéines membranaires GLUT-1 et la neuropiline-1 (NRP1) furent associées à l'entrée des rétrovirus humains HTLV-1 et HTLV-2 (discuté au point 1.4). L'implication de chaque récepteur et la séquence dans laquelle ils interviennent n'est toutefois pas déterminée. L'entrée par multiples récepteurs ajoute des cibles potentiels dans le développement de composés antirétroviraux.

1.3.4 TRANSMISSION PAR CONTACT CELLULE-CELLULE : SYNAPSE VIROLOGIQUE

Certains virus animaux se transmettent plus efficacement par passage direct du virus d'une cellule infectée à une cellule cible que par infection à l'aide de virions libres (65). Ce processus pourrait être particulièrement important dans les tissus où les cellules sont en contact étroit, comme dans les organes lymphoïdes, les neurones et les surfaces épithéliales et endothéliales. HTLV-1 utiliserait majoritairement ce mode de transmission (66). En effet, les cellules naturellement infectées ne produisent que peu de virions, parmi lesquels seulement 1 sur 10^6 est infectieux (67, 68). La transmission par virions libres est donc négligeable par rapport à la transmission par contact cellulaire. Le VIH-1 pourrait également utiliser ce mode de transmission (69). Le site de contact entre la cellule infectée et la cellule cible est nommée synapse virologique.

La synapse virologique est une jonction adhésive stable, dépendante du remodelage du cytosquelette, à travers laquelle le virus est directement transmis (**Figure 1.6**) (70). La présence de molécules d'adhésion telles ICAM-1, ICAM-3 et VCAM, est nécessaire pour la formation de la synapse virologique lors de la transmission de HTLV-1 (71, 72). Une fois la synapse virologique formée, les protéines Env, Gag et le génome viral y sont localisés et sont par la suite transmis dans la cellule cible (73). De plus, l'interaction entre la cellule effectrice et la cellule cible, mène chez cette première, à la polarisation vers la synapse virologique du centre organisateur des microtubules (MTOC).

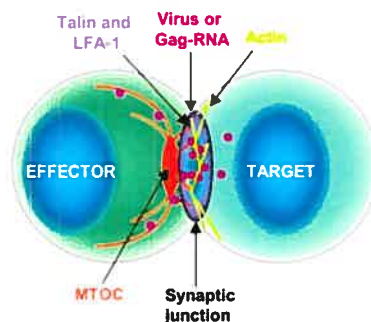


Figure 1.6 Transmission par contact cellule-cellule : synapse virologique. La formation de la synapse virologique implique la polarisation du centre organisationnel des microtubules (MTOC) dans la cellule effectrice. Les molécules d'adhésion Talin et LFA-1 stabilisent la synapse virologique, à travers de laquelle le virus est transféré dans la cellule cible. Modifié de Piguet V. et al. (74)

La transmission du virus à travers la synapse virologique serait un moyen efficace pour contourner différents aspects du système immunitaire humoral, tels les anticorps neutralisants et le système du complément. De plus, ce mode de transmission a pour avantage de favoriser la transmission du virus puisque celui-ci n'a pas besoin de trouver une cellule permissive après avoir été relargué dans la circulation (70).

1.4 ENTRÉE DU VIRUS DE LA LEUCÉMIE DES LYMPHOCYTES T HUMAIN DE TYPE 1 (HTLV-1)

Le virus de la leucémie des lymphocytes T de type 1 (HTLV-1) fut découvert par l'équipe du Dr Robert C. Gallo en 1981(75). Dr Gallo travaillait avec les rétrovirus animaux GALV et BLV depuis déjà plusieurs années quand il découvrit HTLV-1, le premier rétrovirus pathogène humain identifié. Le virus fut isolé à partir de lignées cellulaires dérivées de patients diagnostiqués avec un lymphome cutané. HTLV-1 est un deltarétrovirus complexe de type C possédant les protéines de structure et enzymes classiques de cette classe de virus. En plus des gènes communs aux rétrovirus, le génome de HTLV-1 code pour les protéines auxiliaires Rof, Tof, Rex et Tax (76).

1.4.1 ENTRÉE VIRALE DE HTLV-1

L'enveloppe virale de HTLV-1 est constituée d'une bicouche lipidique, héritée de la cellule productrice, et des glycoprotéines SU (gp46) et TM (gp21) encodées par le gène *env* (77). Ces deux protéines sont produites suite au clivage du précurseur d'enveloppe de 61kDa (Env) (78, 79). Des mutations introduites entre les acides aminés 100-200 de la gp46 inhibent l'entrée de HTLV-1 dans la cellule cible ainsi que la formation de syncytium dans les cellules exprimant Env (80-84). La protéine TM permet la fusion entre les membranes virale et cellulaire (77). La stabilité du gène *env* permettrait d'envisager le développement de peptides ou de molécules ciblant SU (voir section 1.6).

1.4.2 RÉCEPTEURS D'ENTRÉE DE HTLV-1

Il aura fallu attendre plus de 20 ans avant que ne soit identifié le premier récepteur permettant l'entrée de HTLV-1. C'est en 2003 que le transporteur de glucose GLUT-1 fut identifié comme étant un récepteur de HTLV-1 (85). Les caractéristiques du récepteur étaient pourtant connues depuis quelques années.

La première caractéristique du récepteur d'entrée de HTLV-1 est liée au tropisme du virus *in vivo*. HTLV-1 infecte, outre les lymphocytes T CD4+, les lymphocytes T CD8+, les monocytes, les cellules endothéliales et les cellules dendritiques (14, 86-88). Ce virus infecte également presque tous les types cellulaires. De plus, le récepteur de HTLV-1 doit être conservé au sein des espèces vertébrés (89, 90).

La deuxième caractéristique du récepteur a trait à son expression à la surface des cellules cibles et des cellules infectées. Le récepteur doit être exprimé dans les lymphocytes T CD4+ activés (CD45RO+) (91, 92), cibles préférentielles de HTLV-1 *in vivo* (93). Une fois infectées, ces cellules cessent d'exprimer le récepteur ou du moins l'inactive, ce qui diminue leur habileté à former des syncytia avec une cellule exprimant l'enveloppe virale (94, 95).

La troisième caractéristique implique le mode de transmission de HTLV-1, favorisant le contact cellule-cellule à l'infection par virions libres (96). Ceci exige du récepteur d'entrée qu'il soit localisé à cet endroit bien spécifique de la cellule lors de la transmission du virus à travers une synapse virologique.

Plusieurs difficultés techniques permettent d'expliquer le délai entre la découverte de ce virus et l'identification d'un récepteur d'entrée. Premièrement, le caractère ubiquitaire du récepteur chez les lignées cellulaires rendait difficile l'identification de cellules résistantes à l'infection. Deuxièmement, les particules virales de HTLV-1 sont peu infectieuses comparativement aux autres rétrovirus (96). Cette contrainte technique fut surmontée par la production de pseudotypes viraux portant l'enveloppe de HTLV-2, qui utilise le même récepteur que HTLV-1 (97). À ce jour, deux protéines membranaires furent associées à l'entrée de HTLV-1 : GLUT-1 et Neuropiline-1.

1.4.2.1 GLUT-1

GLUT-1, un transporteur de glucose ubiquitaire à 12 domaines transmembranaires, fut le premier récepteur d'entrée de HTLV-1 identifié par Hanon et al. (85). Les membres de cette équipe ont observé que les cellules exprimant l'enveloppe de HTLV-1 acidifiaient le milieu de culture cellulaire moins rapidement que les cellules ne l'exprimant pas et que la consommation de glucose et la production de lactate étaient altérées. Ils se sont alors intéressés aux transporteurs ubiquitaires de glucose et de lactate dont l'expression est augmentée chez les lymphocytes T activés, identifiant ainsi GLUT-1. Ils ont ensuite démontré que l'enveloppe de HTLV-1, ainsi que le domaine de liaison au récepteur précédemment identifié (98), lient GLUT-1 et altèrent son activité métabolique. La surexpression de GLUT-1 favorise à son tour l'infection de cellules cibles par des pseudotypes portant l'enveloppe de HTLV-2. L'ajout de cytochalasine B, un inhibiteur de GLUT-1, permet de bloquer l'entrée des pseudotypes HTLV-2. Une

étude subséquente a démontré l'importance du premier domaine extracellulaire de GLUT-1 lors de l'entrée de HTLV-1 (99).

1.4.2.2 NEUROPILINE-1

L'inhibition de l'expression de GLUT-1 à l'aide de petits ARN interférents (siARN) a permis de diminuer l'infection par les pseudotypes HTLV-2, sans toutefois l'inhiber complètement (85). Ce résultat suggère qu'il pourrait y avoir d'autres récepteurs susceptibles de favoriser l'entrée de ce virus dans une cellule cible en agissant de concert avec GLUT-1.

Récemment, une étude à laquelle nous avons participé démontrait l'implication de la neuropiline-1 (NRP1) dans l'entrée de HTLV-1 (100). NRP1 fut découverte pour la première fois en 1987 chez *Xenopus tadpoles* à l'aide de l'anticorps monoclonal A5 dans une étude visant à identifier les protéines capables de médier la guidance axonale lors du développement neuronal (101, 102). L'ADN complémentaire codant pour une protéine homologue fut également retrouvé chez le poulet (103) et chez la souris (104), démontrant ainsi que la structure primaire de NRP1 était hautement conservée chez les espèces vertébrées. NRP1 est une protéine de 130kDa possédant plusieurs sites de glycosylation. Cette protéine de 923 acides aminés est composée d'une courte queue cytosolique, d'un seul domaine transmembranaire et d'un imposant domaine extracellulaire (105) (**Figure 1.7**). Deux domaines homologues aux molécules du complément C1r et C1s forment l'extrémité N-terminale (domaines CUB ou a1 et a2). Viennent ensuite deux domaines homologues au facteur de coagulation V/VIII (domaines FA58C ou b1 et b2) et un domaine nommé MAM (Meprin, A5, μ -phosphatase) aussi appelé domaine c. La neuropiline-2 (NRP2) possède la même organisation extracellulaire que NRP1 et partage 44% d'identité avec celle-ci (106).

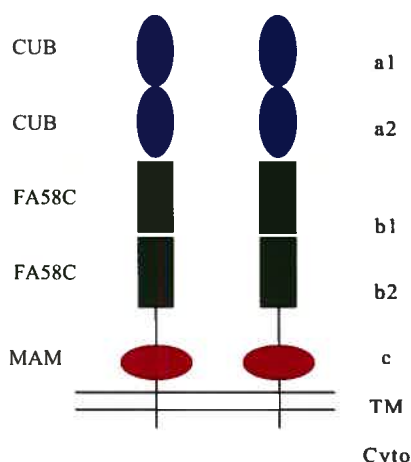


Figure 1.7 Schéma représentant la neuropiline-1 (NRP1). Le domaine extracellulaire de la neuropiline-1 est composé de 2 domaines CUB (a1 et a2), de 2 domaines FA58C (b1 et b2) et du domaine MAM (c). NRP1 est une protéine composée d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytosolique (C-terminale).

La protéine transmembranaire NRP1 interagit avec plusieurs familles de ligands: les sémaphorines de classe 3 (106, 107), les facteurs de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) (108) et le facteur de croissance placentaire (PlGF) (109). Elle participe à la fois à la guidance axonale et à l'angiogenèse. Elle peut également former des homodimères ou des hétérodimères avec la protéine NRP2 (110).

La sémaphorine 3A (Sema-3A) est un facteur chimiorépulsif sécrété par les cellules non ciblées, permettant de diriger les axones au bon endroit lors du développement du système nerveux. La liaison de Sema-3A à NRP1 mène à l'atrophie du cône de croissance axonale (106, 107, 111). Les domaines CUB (a1 et a2) sont nécessaires pour la liaison de Sema-3A à NRP1 (112). Tous les domaines de la partie extracellulaire de NRP1 semblent importants pour l'activité biologique induite par la liaison de Sema-3A. Le domaine cytosolique quant à lui ne semble pas nécessaire pour la transduction de cet effet répulsif (113). D'autres récepteurs ou protéines cellulaires doivent donc être impliqués dans ce processus,

laissant présager l'implication d'une ou de plusieurs autres protéines dans ce processus. Takahashi et al. ont démontré que la transduction de ce signal se fait via la protéine transmembranaire Plexin-1 suite à la liaison de Sema-3A à NRP1 (114). Sema-3A se lie donc à NRP1 qui lie à son tour Plexin-1 via son domaine MAM permettant la transduction du signal par le domaine cytosolique de Plexin-1.

La neuropiline-1 est également impliquée dans l'angiogenèse lors du développement du système vasculaire, en liant le facteur de croissance endothéliale vasculaire 165 (VEGF₁₆₅), un isoforme de VEGF (108). NRP1 lie avec haute affinité VEGF₁₆₅ ($K_d = 320\text{pM}$) et l'expression de NRP1 favorise l'interaction entre ce facteur et KDR (kinase insert domain-containing receptor), un récepteur de VEGF de type 2 (VEGFR-2) promouvant le chimiotactisme de la cellule cible. La co-expression de NRP1 et de KDR augmente la migration cellulaire de 2.5 fois comparativement à l'expression de KDR uniquement. Toutefois, l'expression de NRP1 seule ne permet pas d'induire le chimiotactisme, même si la liaison de VEGF₁₆₅ augmente à la surface cellulaire. Ceci laisse présager ici encore un mécanisme de transduction de signal entre NRP1 et KDR. Les domaines b1 et b2 de NRP1 joueraient un rôle important pour la liaison de VEGF₁₆₅ (112). NRP1 joue un rôle similaire lors de la signalisation induite par le facteur de croissance placentaire (PlGF) et son récepteur flt-1 (109).

Pourquoi la neuropiline-1 pourrait être un candidat intéressant au titre de récepteur ou co-récepteur d'entrée de HTLV-1 ? Tout d'abord, NRP1 se retrouve à la surface des lymphocytes T, des cellules dendritique (115) et des cellules épithéliales (108), principales cellules cibles de HTLV-1 *in vivo*. Cette protéine est également exprimée chez la majorité des lignées cellulaires utilisées en laboratoire (108, 116). De plus, NRP1 est localisée au sein de la synapse immunologique formée entre une cellule dendritique et un lymphocyte T quiescent (115). Il serait alors envisageable de retrouver ce récepteur au sein de la synapse virologique lors de la transmission de HTLV-1. L'expression de NRP1 est également augmentée chez les lymphocytes T CD4⁺ activés (100). Les anticorps dirigés contre NRP1

inhibent la prolifération des lymphocytes T dans une réaction mixte de lymphocyte (115), tout comme la protéine de surface SU de HTLV-1 (92). Pour toutes ces raisons, nos collaborateurs et nous avons entrepris l'investigation du rôle de NRP1 dans l'entrée de HTLV-1.

1.5 ENTRÉE DU VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1 (VIH-1)

L'entrée du VIH-1 dans une cible est un processus séquentiel. La protéine virale SU (gp120) interagit d'abord avec le récepteur cellulaire CD4. Cette interaction induit un changement de conformation de la protéine d'enveloppe CD4 libérant la boucle variable 3 (V3) qui peut ensuite interagir avec le corécepteur (**Figure 1.8**). Cette seconde interaction permet à la protéine virale TM (gp41) de s'ancrer dans la membrane de la cellule cible et de former une structure en épingle à cheveux, menant au rapprochement et à la fusion entre les membranes virale et cellulaire.

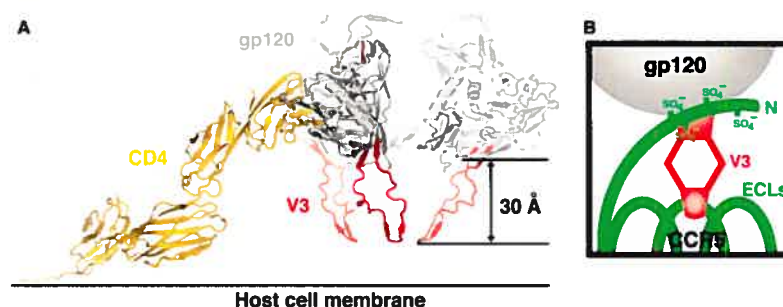


Figure 1.8 L'interaction entre CD4 et gp120 libère la boucle V3. (A) La liaison de la gp120 à CD4 induit un changement de conformation dans la gp120, libérant la boucle V3. Cette figure représente la gp120 sous la forme d'un hétérotrimère. (B) Schéma représentant l'interaction entre la boucle V3 de la gp120 et le corécepteur. Tiré de Huang C.C. et al. (117).

1.5.1 RÉCEPTEUR D'ENTRÉE CD4

Les premières études portant sur l'entrée du VIH-1 permirent de démontrer que les cellules cibles *in vivo* de ce rétrovirus étaient les lymphocytes T CD4⁺ (118). Des études subséquentes démontrèrent que des anticorps monoclonaux dirigés contre CD4 pouvaient bloquer l'infection de cellules cibles (119, 120), et que CD4 pouvait lier directement la protéine d'enveloppe viral gp120 (121). Il fut alors proposé que CD4 est le récepteur d'entrée du VIH-1. Toutefois, ce récepteur ne pouvait agir seul, puisque son expression à la surface de cellules murines non permissives ne favorisait pas l'infection, bien que la gp120 pouvait s'y lier (122). Il devait donc y avoir à la surface des cellules humaines, au moins un autre facteur nécessaire pour l'entrée du VIH-1.

CD4 est une protéine de 56kDa constituée d'un domaine extracellulaire de 370 acides aminés, d'un domaine transmembranaire de 25 acides aminés et d'une queue cytosolique de 38 acides aminés (123). Le domaine extracellulaire est composé de quatre domaines distincts désignés D1 à D4 (124). Le domaine D1, situé à l'extrémité N-terminale, possède une grande homologie de séquence et de structure avec la région variable des chaînes légères des immunoglobulines (Ig). Les autres domaines extracellulaires possèdent peu d'homologie avec la structure primaire des Ig, mais leur conformation est similaire au domaine D1, ce qui fait de CD4 un membre de la grande famille des protéines ressemblant aux Ig. Des modifications postraductionnelles de CD4 mènent à la formation de ponts disulfures stabilisant les domaines D1, D2 et D4 et à l'addition de deux oligosaccharides liés par un pont N entre D3 et D4. Cette protéine, exprimée majoritairement à la surface des lymphocytes T, joue un rôle crucial lors de l'activation des lymphocytes T. Elle lie le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) associé à l'antigène présent à la surface d'une cellule présentatrice d'antigènes.

La production de fragments solubles de CD4 a permis de démontrer l'importance du domaine D1 pour l'interaction avec la gp120 du VIH-1 (125). La résolution de la structure atomique des domaines D1 et D2 a permis d'affiner l'analyse du site d'interaction entre CD4 et SU (126, 127). Des études subséquentes de mutagenèse ont démontré que les résidus chargés Lys-29, Lys-35, Lys-46 et Arg-59, ainsi que le résidu hydrophobique Phe-43, étaient essentiels pour la liaison de la gp120 (128-130). Ces 5 acides aminés formeraient une poche hydrophobique constituée de Phe-43, au centre des résidus chargés (129, 131).

1.5.2 CORÉCEPTEURS CXCR4 ET CCR5

La notion de corécepteur est née des suites de recherches qui ont démontré que l'expression de CD4 n'était pas suffisante pour expliquer le tropisme des différentes souches du VIH-1 pour les cellules *in vitro* (122). Il a également été démontré que l'expression de CD4 sur des cellules non humaines ne permettait pas de rendre ces cellules permissives à l'infection (132). Il devait donc y avoir à la surface cellulaire au moins un facteur qui, de concert avec le récepteur CD4, permettait l'entrée du VIH-1 dans la cellule cible.

1.5.2.1 CXCR4

Le premier corécepteur du VIH-1 fut identifié dans une étude de gain de fonction, en utilisant une stratégie clonale à partir d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) (30). Il fut alors possible de rendre une cellule murine CD4+, permissive à la fusion avec une cellule exprimant l'enveloppe d'une souche virale infectant les lymphocyte T CD4+. Un seul clone a permis de rendre une cellule permissive. Le séquençage de l'ADNc de ce clone démontra que la protéine qu'il encodait faisait partie de la famille des protéines à 7 domaines transmembranaires couplées aux protéines G. À cette époque, aucun ligand ni activité n'était associé à ce récepteur. Il prit alors le nom de fusin. Dans cette même étude, des expériences de perte de fonction à l'aide d'anticorps

monoclonaux vinrent appuyer le rôle de la fusin comme corécepteur à l'entrée du VIH-1.

Peu de temps s'est écoulé entre la découverte de la fusin et l'identification de son ligand naturel, la chimiokine SDF-1 (aussi appelée CXCL12) (133). Ce récepteur prit alors le nom de CXCR4 en référence à la structure de son ligand. CXCR4 est une protéine de 352 acides aminés exprimée à la surface d'une grande variété de cellules hématopoïétiques comme les neutrophiles, les monocytes/macrophages, les lymphocytes T et leurs précurseurs, les cellules progénitrices CD34⁺ du sang et de la moelle osseuse, ainsi que les cellules dendritiques (134-136). La liaison de SDF-1 à CXCR4 active plusieurs voies de signalisation intracellulaire. Cette interaction exclusive mène à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et au chimiotactisme (déplacement d'une cellule selon un gradient de chimiokines) (137). La surexpression de CXCR4 à la surface d'une cellule épithéliale mammaire tumorale lui permet de migrer du site primaire du développement de la tumeur, vers des organes métastatiques qui sécrètent SDF-1, comme le foie, la moelle osseuse et les poumons (138).

1.5.2.2 CCR5

L'expression de CXCR4 à la surface d'une cellule cible ne favorisait pas l'infection de toutes les souches du VIH-1. En effet, la présence de ce corécepteur rendait les cellules cibles permissives à l'infection par les souches adaptées au laboratoire, mais pas par les souches d'isolats primaires. Ces dernières souches devaient donc utiliser un autre co-facteur lors de l'entrée. En 1995, Cocchi et al. ont démontré que les chimiokines RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β , sécrétées par les lymphocytes T CD8⁺, permettaient d'inhiber de façon dose-dépendante l'infection par le VIH-1 (139). De plus, ces chimiokines ne bloquaient que les souches d'isolats viraux primaires et non les souches adaptées. Au même moment, un récepteur possédant les spécificités pour ces chimiokines fut identifié et nommé

CCR5 (140-142). Ces études laissaient entrevoir l'implication de ce récepteur de chimiokines dans l'entrée VIH-1. En l'espace de quelques semaines, cinq équipes de chercheurs identifièrent CCR5 comme étant un corécepteur d'entrée du VIH-1 responsable de l'infection des macrophages (132, 143-146).

CCR5 est également un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G, liant les chimiokines de types CC. Il est composé de 355 acides aminés et est exprimé à la surface des cellules dendritiques dérivées du sang (136, 147), des cellules hématopoïétiques progénitrices CD34+ (148) et les lymphocytes T CD4+ activés et mémoires (149, 150). Il est également exprimé sur les thymocytes CD4+ et CD8+, et sur les cellules de Langerhans (151, 152). Il se trouve finalement à la surface des macrophages et des lymphocytes T dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes. Comparativement à CXCR4, ce récepteur peut lier avec haute affinité plusieurs chimiokines : RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β . D'autres ligands comme MCP-3, MCP-4, MCP-1 et l'éotaxine lui sont aussi associés (153). Ces chimiokines peuvent lier CCR5 à son domaine N-terminale ainsi qu'aux première et deuxième boucles extracellulaires (154). Le domaine N-terminale des chimiokines permet l'activation de CCR5 en liant des résidus situés au niveau des domaines transmembranaires (structure appelée poche de liaison des ligands; « ligand binding pocket »). Cette liaison induit un changement de conformation du récepteur ayant pour effet de dissocier la protéine G qui lui était liée (155). La protéine G activée ira à son tour activer la phospholipase C, générant ainsi la production d'inositol-1,4,5-triphosphate et de diacylglycerol (156, 157). Ces seconds messagers permettent l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ainsi que l'activation de la protéine kinase C. L'internalisation de CCR5 médiée par la β -arrestine mène à l'inactivation du récepteur (154).

CCR5 est impliqué dans l'initiation de la réponse immune. Au site d'infection, les cellules dendritiques et le macrophage s'activent et sécrètent les chimiokines pouvant activer CCR5. Ceci a pour effet d'attirer les cellules effectrices au site d'infection par chimiotactisme et ainsi de contrôler ou éliminer

le micro-organisme en question (154). Les chimiokines RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β sont également impliquées dans les processus inflammatoires. Les lymphocytes T spécifiques à un antigène et les cellules « natural killer » (NK) sécrètent ces molécules (158) qui attireront les lymphocytes T matures, les monocytes et les cellules NK au site d'infection (159, 160).

Les souches virales utilisant le corécepteur d'entrée CCR5 sont responsables de l'établissement de l'infection par le VIH-1. Des études de génétique virale permirent de démontrer que les corécepteurs d'entrée n'ont pas tous un rôle équivalent dans l'entrée du VIH-1. En 1996, Liu et al. démontrèrent que des individus étant exposés à répétition au virus, sans être infectés, portaient un polymorphisme génétique homozygote pour le corécepteur CCR5, *ccr5 Δ 32* (161). Curieusement, cette mutation est retrouvée presque uniquement chez les caucasiens (discuté dans (162)). Cette mutation se traduit par une délétion de 32 paires de base, introduisant un changement de cadre de lecture menant à l'arrêt prématuré de la synthèse du récepteur (**Figure 1.9**). Le récepteur se dirige alors vers la voie de dégradation des protéines au lieu de se retrouver à la surface cellulaire. Par la suite, il fut démontré que les cellules de ces individus sont résistantes à l'infection par des isolats viraux primaires utilisant le corécepteur CCR5 (163). Les individus homozygotes pour *ccr5 Δ 32* ne semblent avoir comme phénotype que la résistance à l'infection par le VIH-1. L'ensemble de ces résultats laissait supposer que CCR5 était le corécepteur majeur lors de l'établissement de l'infection. Ce polymorphisme n'est toutefois pas un gage de protection à 100%, tel que démontré dans plusieurs études (164-167). Les individus hétérozygotes pour *ccr5 Δ 32* semblent progresser plus lentement vers le stade SIDA que les individus possédant le gène de type sauvage (168-171).

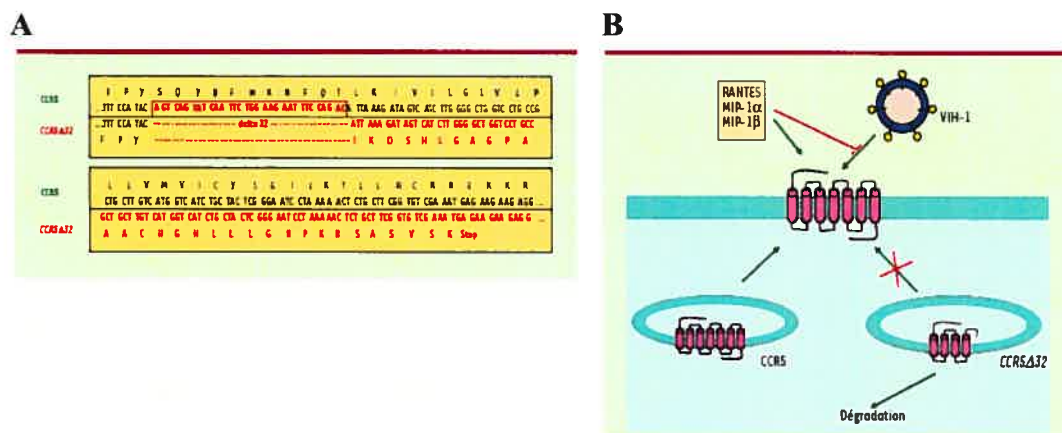


Figure 1.9 *ccr5*Δ32. (A) La délétion de 32 paires de bases dans le gène de CCR5 mène à un changement de cadre de lecture insérant un codon d'arrêt de traduction prématuré. (B) Trois des 7 domaines transmembranaires de CCR5 sont absents. La protéine est donc mal repliée et conduite dans la voie de dégradation. Tiré de Janvier S. et Heveker N. (162).

1.5.3 TROPISME ET ÉVOLUTION PATHOLOGIQUE

Des observations sur le comportement *in vitro* des différents isolats viraux primaires ont permis de classer les souches virales selon leur capacité à induire ou non la formation de syncytium entre une cellule infectée par le VIH-1 et une cellule saine (« syncytium inducing » ou « non syncytium inducing ») (172). Cette terminologie fut modifiée à la suite de l'identification des corécepteurs d'entrée CCR5 et CXCR4. Depuis ce temps, les souches virales sont classées selon le corécepteur utilisé : R5 tropique, X4 tropique ou R5X4 tropique (dual tropique), pour les souches qui utilisent l'un ou l'autre de ces corécepteurs (173).

Comme il fut discuté précédemment, l'établissement de l'infection se fait majoritairement par les virus R5-tropique. Des études longitudinales *in vivo* ont démontré que l'émergence des souches X4R5 et X4 survenait plus tard dans l'évolution de la maladie (174, 175). La présence de souches X4 est généralement liée à un déclin rapide du compte de lymphocytes T (176). Il est important de

noter que l'absence de souche X4 n'est pas liée à une non progression (175, 177). Le lien entre le tropisme et l'évolution de la maladie pourrait résider au niveau de l'expression des corécepteurs à la surface des différentes lignées lymphocytaires (**Figure 1.10**). Les lymphocytes T CD4⁺ activés et mémoires expriment à la fois CCR5 et CXCR4 alors que les lymphocytes T CD4⁺ naïfs n'expriment que CXCR4. L'émergence des souches X4 permet au virus d'attaquer à la source les lymphocytes T CD4⁺.

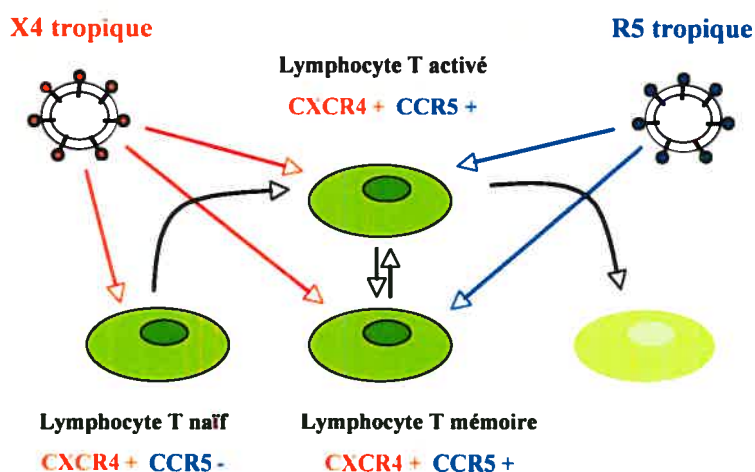


Figure 1.10 Différentes cibles des souches X4 et R5 tropiques. Les lymphocytes T CD4⁺ activés et mémoires expriment CCR5 et CXCR4. Les lymphocytes T naïfs quant à eux n'expriment que le corécepteur CXCR4.

1.6 ENTRÉE DES RÉTROVIRUS COMME CIBLE THÉRAPEUTIQUE

Le développement de molécules ciblant l'entrée des rétrovirus nécessite des connaissances approfondies sur les interactions entre les protéines d'enveloppe virale et les récepteurs/corécepteurs. Une seule molécule ciblant l'entrée est présentement employée dans un traitement antirétroviral. L'utilisation de l'Enfuvirtide ou T20, une molécule qui bloque la fusion du VIH-1, a été approuvée

en 2003 pour un usage combinatoire avec d'autres antirétroviraux chez des patients pour qui les traitements conventionnels ne sont plus efficaces (178).

1.6.1 DÉTAILS MOLÉCULAIRES

L'inhibition de l'entrée des rétrovirus pourrait se faire selon deux approches. La première s'attaque directement au virus, en ciblant la protéine Env. Elle serait efficace pour les rétrovirus qui possèdent peu de diversité de séquence génétique, comme HTLV-1 (179). En effet, on ne retrouve que 1 à 4% de variation au sein de la séquence nucléotidique chez ce virus. Il serait alors intéressant de développer des composés qui cibleraient la protéine SU de HTLV-1 bloquant la liaison avec le récepteur GLUT-1 ou le co-facteur NRP1. Par exemple, l'identification du domaine de NRP1 responsable de cette interaction pourrait mener, dans un premier temps, au développement de dérivés peptidiques bloquant l'entrée. À ce jour, aucun inhibiteur antiviral n'a été développé pour contrer HTLV-1.

Cette première approche s'est avérée peu efficace dans l'inhibition de l'entrée du VIH-1. Ceci peut s'expliquer, en partie, par une grande diversité génétique au sein des isolats viraux, qui peut atteindre jusqu'à 30% à l'intérieur du gène codant pour l'enveloppe (179). Cette caractéristique nécessite donc une deuxième approche selon laquelle les protéines cellulaires sont la cible. En effet, l'entrée des rétrovirus peut être inhibée à l'aide de dérivés peptidiques ou de petites molécules ciblant les récepteurs et corécepteurs. Ceux-ci peuvent agir comme des agonistes, activant la fonction naturelle du récepteur (**Figure 1.11**). Ils peuvent également inhiber cette activité en agissant comme des antagonistes. Par exemple, TAK779, un inhibiteur d'entrée du VIH-1 ciblant CCR5, bloque le flux calcique induit par la chimiokine RANTES (180). Finalement, ces agents antirétroviraux pourraient être des agonistes inverses du récepteur. Il est donc important de connaître l'activité d'un inhibiteur d'entrée virale sur la fonction

naturelle du récepteur qu'il cible. Ceci permettra, en partie, d'anticiper les effets secondaires induits par cette molécule.

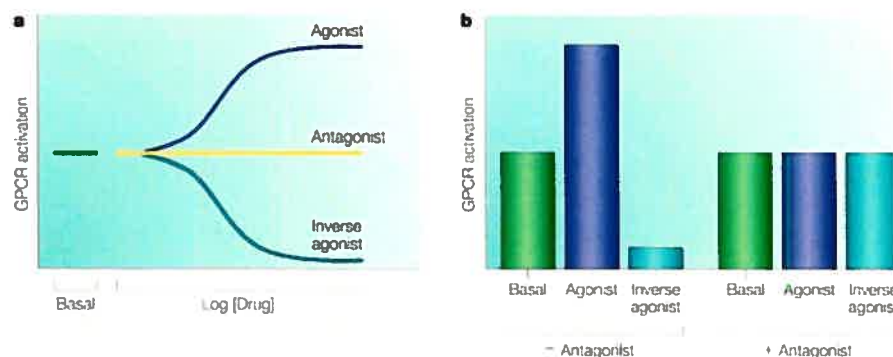


Figure 1.11 Effet des divers ligands sur l'activation des récepteurs cellulaires. (a) L'agoniste active le récepteur alors que l'agoniste inverse réduit la proportion de récepteurs actifs en absence de ligand. (b) L'antagoniste réduit l'effet des autres ligands. Tiré de *The State of GPCR Research in 2004* (181).

1.6.2 INHIBITEURS D'ENTRÉE CIBLANT LE RÉCEPTEUR DU VIH-1

La découverte de CD4 comme récepteur d'entrée du VIH-1 laissait présager une nouvelle cible prometteuse pour bloquer l'infection de ce virus. En effet, l'infection de toutes les souches virales, qu'elles soient X4, R5 ou X4R5 tropiques, nécessitent la liaison de la protéine virale SU à CD4. Bien que certaines souches adaptées *in vitro* peuvent entrer directement dans la cellule cible en absence de CD4 (182), il ne serait pas avantageux pour le virus d'utiliser ce mode d'entrée puisqu'il deviendrait ainsi plus susceptible à la neutralisation par le système immunitaire (183, 184).

De petites molécules ciblant CD4, comme la cyclotriazadisulfonamide (CADA), ont été développées afin de bloquer l'entrée du VIH-1 (185). CADA permet de bloquer l'entrée de souches virales adaptées au laboratoire et de souches primaires d'isolats cliniques et ce, indépendamment du corécepteur exprimé à la

surface (186, 187). La liaison de CADA à CD4 mène à une baisse de la quantité de ce récepteur à la surface cellulaire et intracellulaire. Cette activité est réversible, l'expression en surface cellulaire de CD4 étant restaurée à un niveau normal suite au retrait de la molécule (187). Ce mode d'action pourrait être envisageable pour l'inhibition de l'entrée de HTLV-1 par la neuropiline-1 (voir section 1.4).

1.6.3 INHIBITEURS D'ENTRÉE CIBLANT LES CORÉCEPTEURS DU VIH-1

La première classe d'inhibiteurs d'entrée ciblant le corécepteur CCR5 est composée des dérivés peptidiques synthétiques de RANTES. AOP-RANTES est le premier de ces dérivés à avoir démontré une activité antirétrovirale intéressante (188). Il inhibe l'entrée du VIH-1 en agissant comme compétiteur direct de CCR5, en plus de favoriser l'internalisation du récepteur (189).

L'entrée par le corécepteur CCR5 peut également être inhibée par de petites molécules. Le premier composé non-peptidique ciblant ce corécepteur a été TAK779 (Takeda S.A.) (190, 191). Il inhibe l'entrée de plusieurs souches R5 (avec des IC_{50} d'environ 3nM) en bloquant la liaison de la gp120 au corécepteur. Les essais cliniques pour TAK779 ont été arrêtées à cause de complication au site d'injection. La nouvelle génération de molécules développées par Takeda comprend TAK220 et TAK652 (192, 193). Ces molécules permettent également d'inhiber de façon dose-dépendante la réplication du VIH-1 en ciblant CCR5. D'autres molécules, comme Vicriviroc (Schering-Plough Corporation) (194) et Aplaviroc (Ono et GlaxoSmithKline) (195), furent par la suite développées. Les études de phase clinique III pour Aplaviroc ont été arrêtées à cause de toxicité hépatique. Vicriviroc est présentement en essai clinique de phase II. En ce moment, la molécule la plus intéressante est Maraviroc, développée par Pfizer Inc (196). Elle permet de bloquer, avec des IC_{50} de l'ordre du nM, l'infection de plusieurs souches R5 incluant, en plus des 200 isolats cliniques, 43 isolats primaires provenant de plusieurs clades et de plusieurs régions géographiques. Cette molécule est un antagoniste de CCR5 et il compétitionne avec les

chimiokines RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β . De plus, la combinaison de Maraviroc avec les autres classes d'inhibiteurs montre un effet additif sur l'inhibition de la réplication virale *in vitro*.

La principale inquiétude dans le développement d'inhibiteurs d'entrée ciblant CCR5 est la pression sélective que pourrait induire de tels composés sur l'émergence des virus X4 tropiques. L'émergence de telles souches pourraient accélérer la progression vers le stade SIDA (voir section 1.5.3). Les résultats découlant des essais cliniques de phase II pour Maraviroc, montrent une augmentation du ratio de virus X4 tropique par rapport aux virus R5 tropiques (197). Cette augmentation du ratio est due à une diminution du nombre de virus R5 tropiques, et non à une augmentation de la quantité de virus X4 tropiques. La quantité de virus X4 tropique est donc constante, même si la charge virale diminue significativement chez les patients infectés. Ces résultats suggèrent que les inhibiteurs d'entrée ciblant CCR5 ne favorisent pas l'émergence des souches X4 tropiques.

Plusieurs approches ont été tentées afin de bloquer l'entrée du VIH-1 par CXCR4. Le développement de dérivés de SDF-1 a permis d'inhiber l'infection de souches X4 avec une activité antivirale (IC₅₀) de l'ordre de 10 μ M (198). Un analogue de ces peptides a d'ailleurs permis de bloquer l'entrée du VIH-1 sans interférer avec la fonction intrinsèque de CXCR4. De petites molécules non peptidiques permettent également de bloquer l'entrée par CXCR4. L'AMD3100 (AnorMED Inc, Canada) inhibe sélectivement l'entrée par CXCR4 avec un IC₅₀ de 1-10nM (199). L'AMD070 fait partie de la deuxième génération de molécules ciblant CXCR4 développées par AnorMED. Elle est maintenant en essai clinique de phase Ib/IIa (200).

1.7 MODÈLES EXPÉRIMENTAUX *IN VITRO* POUR L'ÉTUDE DE L'ENTRÉE DES RÉTROVIRUS

Plusieurs modèles expérimentaux ont été mis au point afin d'étudier l'entrée des rétrovirus dans une cellule cible. Ces systèmes ont permis d'identifier les récepteurs d'entrée des rétrovirus ainsi que les domaines et résidus de ceux-ci responsables de l'interaction avec les protéines d'enveloppe virale. Parmi ces modèles expérimentaux, on compte les lignées cellulaires exprimant un gène rapporteur et les pseudotypes viraux.

1.7.1 MODÈLES CELLULAIRES RAPPORTEURS

Les lignées cellulaires rapporteuses permettent de quantifier les niveaux d'infection d'un virus. Elles expriment, en plus des récepteurs d'entrée, un gène rapporteur dont l'expression est sous le contrôle du promoteur du virus d'intérêt. Ces gènes codent pour des protéines facilement détectables *in vitro*, telle la β -galactosidase ou la luciférase. L'activité de ces deux enzymes peut être mesurée à l'aide d'essais colorimétriques. Ce modèle expérimental nécessite l'utilisation de particules virales infectieuses, qu'elles soient extraites d'isolats primaires ou produites *in vitro*. L'expression endogène des récepteurs/corécepteurs à la surface des lignées cellulaires rapporteuses doit également être connue avant d'entreprendre l'étude de l'entrée virale. Les études portant sur l'identification du récepteur de HTLV-1 furent ralenties, en partie, par le fait que les particules virales de HTLV-1 sont peu infectieuses et difficilement produites *in vitro* (voir section 1.4). Cette contrainte ne permet pas de tirer avantage de ce système expérimental.

Les particules virales du VIH-1 sont quant à elles suffisamment infectieuses *in vitro* pour envisager le développement de cellules rapporteuses. De plus, le tropisme restreint aux cellules exprimant CD4 et les corécepteurs permet l'utilisation de cellules non-permissives à l'infection. Il est donc possible

d'exprimer dans ces cellules, en plus d'un gène rapporteur, le récepteur et l'un ou l'autre des corécepteurs du VIH-1. Ces cellules permettent entre autres de déterminer le tropisme des souches virales et de tester la sélectivité d'inhibiteurs ciblant les corécepteurs CXCR4 ou CCR5. Labrosse et al. utilisèrent ce système afin d'étudier la sélectivité de l'AMD3100, un inhibiteur d'entrée ciblant CXCR4 (199). Ils ont employé la lignée cellulaire astrocytaire humaine U373MG qui, de façon endogène, n'exprime ni CD4, ni les corécepteurs CCR5 ou CXCR4. Ils ont transfecté ces cellules de façon stable avec une cassette d'expression codant pour le gène rapporteur *lacZ*, dont l'expression est sous le contrôle du promoteur LTR du VIH-1. Ces cellules ont également été transfectées de façon stable avec un plasmide codant pour CD4 et avec l'un ou l'autre des plasmides codant pour le corécepteur CXCR4 ou CCR5. Ils obtinrent ainsi deux lignées cellulaires identiques, à l'exception du corécepteur d'entrée exprimé à leur surface. Ces cellules, nommées U373MG X4.15 et U373MG R5.3, furent utilisées afin de démontrer que le composé AMD3100 inhibait sélectivement l'entrée des souches X4 tropiques du VIH-1. Elles ont également été utilisées dans notre étude afin d'identifier des composés inhibant l'entrée du VIH-1 en ciblant le corécepteur CCR5.

1.7.2 PSEUDOTYPES VIRAUX

L'identification des protéines GLUT-1 et NRP1 comme facteurs favorisant l'entrée de HTLV-1 a été possible grâce à la production de pseudotypes viraux portant l'enveloppe de HTLV-1 ou HTLV-2 (85, 100). Les pseudotypes sont des particules virales infectieuses, qui ne peuvent se répliquer dans la cellule cible puisqu'elles ne transportent que le gène rapporteur. Le génome viral n'est donc pas encapsidé dans les pseudotypes viraux. Ils sont composés des protéines de structure et enzymes d'un rétrovirus dont la réplication est efficace *in vitro*, comme VSV ou MLV. Les protéines d'enveloppes peuvent provenir d'un autre virus, dans ce cas-ci, HTLV-1 ou HTLV-2. Il est ainsi possible de produire deux particules virales identiques, à l'exception des protéines d'enveloppe.

Comparativement au modèle expérimental précédent, le gène rapporteur est présent dans les pseudotypes viraux et non dans la cellule cible. Les particules virales sont produites en co-transfectant le plasmide codant pour le génome de VSV ou MLV dans lequel le gène *env* fut délété, le gène rapporteur *lacZ* et un plasmide codant pour l'enveloppe du virus d'intérêt.

1.8 BUT DE L'ÉTUDE

L'entrée des rétrovirus est une cible thérapeutique très intéressante. Le développement d'agents antirétroviraux dirigés contre les récepteurs d'entrée passe par la compréhension au niveau moléculaire des interactions entre les protéines de la cellule cible et l'enveloppe virale. Notre étude porte sur deux étapes du processus menant au développement de composés antiviraux : la caractérisation du domaine d'interaction entre un récepteur d'entrée et SU et le test de composés ciblant l'entrée.

Tout d'abord, nous voulions caractériser le domaine de la neuropiline-1 (NRP1) responsable de l'interaction avec l'enveloppe de HTLV-1. Nos collaborateurs ont récemment démontré que ce récepteur lie la protéine SU de HTLV-1 en plus de favoriser l'entrée de pseudotypes portant l'enveloppe de HTLV-1 ou HTLV-2 (100). Des mutants de NRP1 portant des délétions pour les différents domaines extracellulaires nous ont permis d'étudier l'interaction avec SU. Il serait ensuite possible de produire ce domaine d'intérêt sous forme soluble afin de tenter de bloquer l'entrée du virus dans une cellule cible.

En parallèle, nous nous sommes intéressés au pouvoir antiviral de molécules identifiées comme inhibiteur de CCR5, un corécepteur à l'entrée du VIH-1. Ces molécules, identifiées dans une étude de criblage à haut débit, inhibent le flux calcique induit par la chimiokine RANTES (201). Nous avons testé ces molécules dans un système de cellules rapporteuses afin d'identifier celles qui démontrent une activité antivirale sélective pour le corécepteur CCR5. Ces molécules pourraient servir de base dans le développement de composés plus actifs et plus sélectifs.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Culture cellulaire, transfections et plasmides

Les cellules adhérentes HEK293T, Hela P4, U373MG X4.15 et U373MG R5.3 ont été maintenues en culture dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO) enrichi avec 10 % sérum de veau fœtal (Cansera International Inc), 100 unités/mL de pénicilline et streptomycine et 2mM de L-glutamine (GIBCO). Les cellules Hela P4 expriment de façon stable CD4, CXCR4 et le gène rapporteur *lacZ* sous le promoteur LTR du VIH-1. Les lignées cellulaires U373MG X4.15 et U373MG R5.3 ont d'abord été transfectées de façon stable avec un plasmide codant pour CD4 et une cassette d'expression contenant le gène rapporteur *lacZ* sous le promoteur LTR du VIH-1 (199). Elles ont ensuite été transfectées de façon stable avec CXCR4 (U373MG X4.15) ou avec CCR5 (U373MG R5.3). La β -galactosidase possède une séquence de localisation nucléaire permettant de différencier les cellules infectées de celles qui sont non infectées. Les cellules HEK293T et Hela P4 ont été transfectées à l'aide de la polyéthylénimine (PEI).

Le plasmide pSecTagA-sNRP1 qui code pour la neuropiline-1 sous forme soluble (sNRP1) possède un site de multiclonaage flanqué en aval et en amont de séquences codant pour des épitopes immunologiques (gracieusement fourni par Claudine Pique, Hôpital Saint-Louis, Paris). Ainsi, il permet de fusionner à l'extrémité N-terminale un épitope immunologique HA, et deux épitopes immunologiques à l'extrémité C-terminale, cMyc et His-6. Les plasmides codant pour CMV-HTLV-SU et CMV-HTLV-1-Env-Stop, utilisés pour la co-immunoprécipitation, ont également été fournis par Claudine Pique. Le plasmide CMV-HTLV-1-Env-Stop possède un codon d'arrêt avant le gène *env*. Il a servi de contrôle négatif pour l'expression du gène d'enveloppe (81, 100). Les plasmides MLV- Δ Env, HTLV-2-Env, A-MLV-Env et Ψ LacZ, permettant la production des pseudotypes HTLV-2 et A-MLV, ont été gracieusement fournis par M. Sitbon (Montpellier, France).

Construction des mutants du récepteur neuropiline-1 (NRP1)

Les mutants de NRP1 soluble (sNRP1) et de type sauvage ont été obtenus par mutagenèse dirigée selon la méthode classique de Kunkel (202). La matrice simple brin de pSecTagA-sNRP1 a été produite à l'aide du phage M13K07 (New England Biolabs). Les mutants portent des délétions complètes des domaines extracellulaires a1, a2, a (a1 + a2), b et C. Deux approches ont été employées pour créer les mutants de délétion. La première, utilisée pour les mutants a1 et a2, consiste à utiliser une seule amorce couvrant les régions en amont et en aval de la région à déléter (Figure 2.1). L'appariement d'une telle amorce avec le vecteur pSecTagA-sNRP1 simple brin a pour effet d'insérer une boucle correspondant au domaine à déléter. Les séquences de ces amorces sont les suivantes : **Δa1**, 5'GGT GCT GTA TAG TTC TAG AAC AGC GAG CGT AGT CTG GGA CG3'; **Δa2**, 5'CCA TGC CCA GAG CCT CCA TAC ATT CTG GCC CTC TCT TGA AGA TTT C3'. La deuxième approche, utilisée pour les mutants a, b et c, implique deux amorces s'appariant avec la région en amont ou en aval de la région à déléter (Figure 2.2). Chacune de ces 2 amorces possède un site de restriction *AgeI* permettant l'excision du domaine d'intérêt. Les séquences des oligonucléotides sont les suivantes : **Δa start** 5'TTA TAG TCC CGC CAC ATT TAC CGG TGC GAG CGT AGT CTG GGA CGT CG3'; **end** 5' CCA TGC CCA GAG CCT CCA TAC AAC CGG TAT CTT CAG AGA TGC TGC TCT G3'; **Δb start** 5' CCC AGA GCC TCC ATA CAA CCG GTC TTG AAA TCT TCA GAG ATG C3'; **end** 5' CCC ATT GGG TGT CGT GGG TCC ACC GGT AGG CAC TTC TAC TTC ACA GCC C3'; **Δc start** 5' GAG TTC CCG ACA TAC GGA CCG GTC TGC GAG TTT GGC TGG G3'; **end** 5'CTA GGT CTG TTG GTT TTG CAA CCG GTT CCTG AGG AAT GTG GTT G3'. Les mutants de NRP1 de type sauvage ont été construits en ajoutant le domaine transmembranaire, excisé du vecteur pCDNA3-NRP1 par les sites *EcoRV*, à sNRP1 et aux mutants (Figure 2.2). Le codon d'arrêt de traduction, présent en aval de la séquence codant pour le domaine transmembranaire de NRP1, ne permet plus de fusionner les épitopes

cMyc et His₆ à la protéine. NRP1 ne possède alors que l'épitope HA à son extrémité N-terminale.

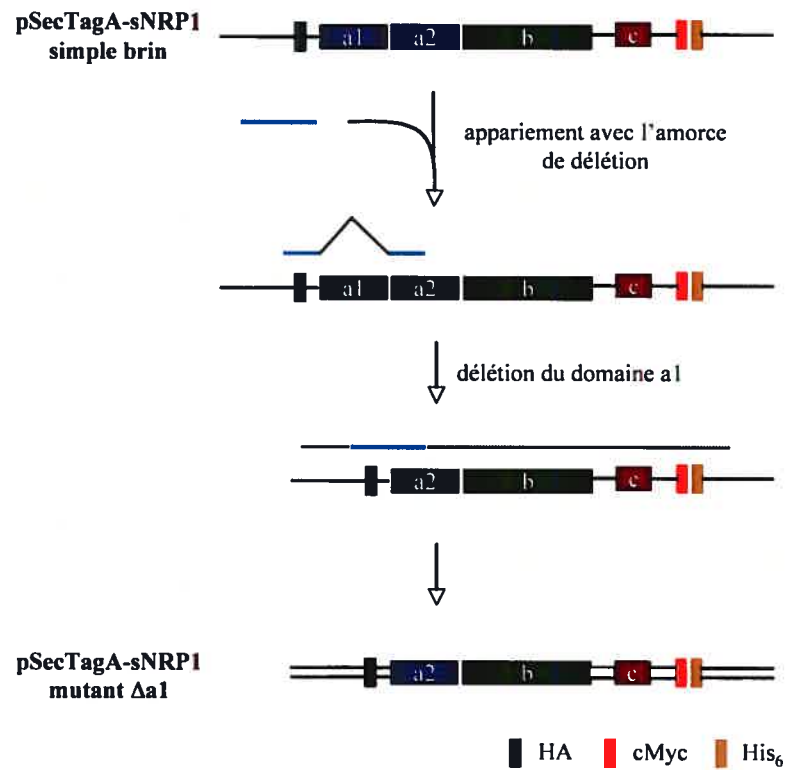


Figure 2.1 Schéma de la mutagenèse dirigée pour les mutants $\Delta a1$ et $\Delta a2$. Les mutants portant des délétions des domaines a1 ou a2 ont été créés à l'aide d'une seule amorce reconnaissant l'amont et l'aval du domaine d'intérêt. Il se forme alors une boucle qui correspond au domaine d'intérêt. La construction du mutant $\Delta a1$ est représentée. La même approche fut utilisée pour la construction du mutant $\Delta a2$.

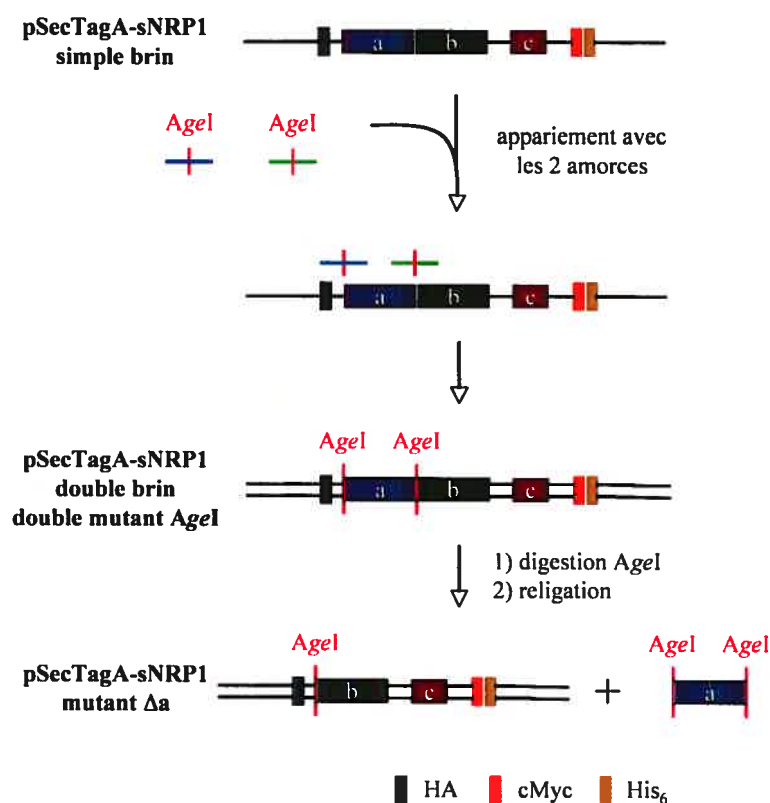


Figure 2.2 Schéma de la mutagenèse dirigée pour les mutants Δa , Δb , Δc . Les mutants sNRP1 portant des délétions pour les domaines a, b et c ont été créés à l'aide de deux amorces qui reconnaissent les séquences en amont ou en aval du domaine d'intérêt. L'insertion de 2 sites de restriction **Agel** permet l'excision du domaine.

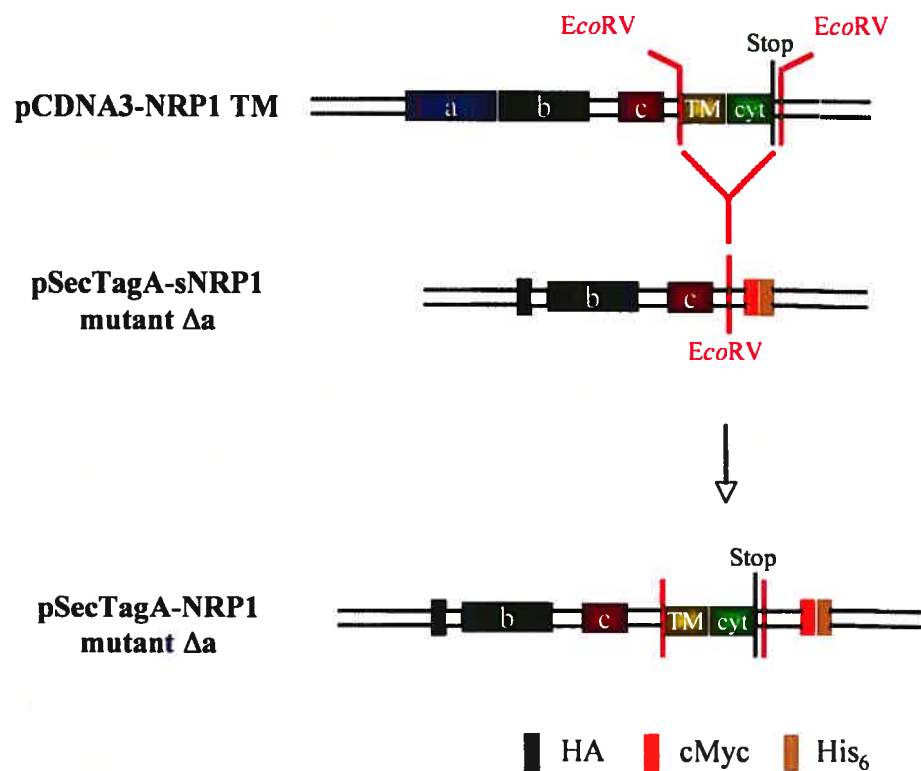


Figure 2.3 Schéma du clonage du domaine TM dans le vecteur pSecTagA-sNRP1. Le domaine transmembranaire (TM) a été excisé du plasmide pCDNA3-NRP1 TM par le site de restriction *EcoRV* pour être introduit dans le plasmide pSecTagA-sNRP1 (site unique *EcoRV*). Un codon stop fut également inséré en amont des épitopes immunologiques cMyc et His₆.

Cytométrie en flux

10^6 cellules HEK293T transfectées avec 3 μ g de NRP1 TM ou les mutants sont récupérées à l'aide d'une solution de PBS (phosphate-buffered saline) 24 heures après la transfection. Elles sont ensuite incubées avec un premier anticorps monoclonal anti-HA (surnageant de l'hybridome 12CA5, 45 minutes à 4°C). Deux lavages avec du PBS précèdent le marquage avec le deuxième anticorps FITC-labeled goat anti-souris (BD) (1:100 dans PBS + SVF 2% , 30 minutes à 4°C). Suivant les 2 derniers lavages, les cellules sont resuspendues dans du PBS + formaldéhyde 1%. Finalement, l'intensité de la fluorescence à la surface des cellules est mesurée grâce à la cytométrie en flux à l'aide de l'appareil FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience).

SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western

10^6 cellules HEK293T ont été mises en culture et transfectées avec 2 μ g de sNRP1 ou les mutants Δa , $\Delta a1$, $\Delta a2$, Δb , $\Delta b1$, $\Delta b2$ et Δc . Les cellules sont récupérées avec du PBS 24h post-transfection. Elles sont ensuite resuspendues dans du tampon de lyse (Tris pH 8 20mM, NaCl 120mM, EgTA 0,2mM, NaF 0,2mM, Sodium déoxycholate 0,2% Nonidet P-40 0,5%). Un mélange de protéases est ajouté au tampon de lyse (Sigma-Aldrich). Les protéines ont été ensuite dosées à l'aide de la méthode de Lowry et al. (203) (DC Protein Assay, Bio-Rad). 35 μ g de protéines ont été migrées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 7,5% en présence de sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE). Les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinyle (PVDF; Roche) qui est ensuite bloquée durant la nuit (4°C) avec du PBS contenant 0,2% de TWEEN-20 (Rockland) et 1% d'albumine de sérum bovin (BSA). Elle est ensuite incubée pendant 60 minutes avec un premier anticorps de souris anti-HA monoclonal 12CA5 dilué 1:10 dans du PBS contenant 0,2% de TWEEN-20 (Sigma-Aldrich). Suivant les 4 lavages avec du PBS-TWEEN 0,2%, la membrane est mise en présence d'un anticorps anti-souris couplé à la peroxydase (1:5000) (Jackson) et

incubée 60 minutes. Quatre autres lavages sont nécessaires. La révélation se fait à l'aide du kit Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche).

Les mutants $\Delta a1$, $\Delta a2$, Δb et Δc furent également détectés à l'aide d'un anticorps anti-cMyc. La membrane de polyvinyle fut lavée de l'anticorps anti-HA (« stripping »). Elle fut incubée dans une solution composée de 62,5mM de tampon tris-glycine, 2% sodium dodecyl sulfate et 0,014% d'acide 3-hydroxy-alpha-mercapto-beta-methylcinnamic. La membrane est incubée pendant 30 minutes à 50°C avec rotation. Elle est ensuite lavée 3 fois avec de l'eau bidistillée et incubée avec la solution de bloquage à 4°C pour la nuit. La détection de sNRP1 et des mutants se fait à l'aide de l'anticorps de souris anti-cMyc monoclonal 9E10 (surnageant de l'hybridome) et d'un anticorps anti-souris couplé à la peroxydase (1:5000) tel que décrit ci-haut.

Co-Immunoprécipitation

10⁶ cellules HEK293T ont été mises en culture et transfectées avec 3µg de pCDNA3 ou co-transfectées avec 1,5µg de plasmide codant pour HTLV-1-SU ou Env-stop et 1,5µg de plasmide codant pour sNRP1 et les mutants. Les cellules sont récupérées avec du PBS 24h post-transfection pour être ensuite incubées avec le tampon de lyse. Le lysat est incubé pour la nuit (4°C, inversion) avec un pool de sérum de patients infectés par HTLV-1 (3%) (gracieuseté de Claudine Pique, Hôpital Saint-Louis, Paris). La précipitation du complexe HTLV-1 SU-sNRP1 a été faite avec des billes d'agarose liées aux protéines A/G (Calbiochem) (4°C, inversion, pour la nuit). Le précipité est ensuite lavé 4 fois avec le tampon de lyse et les complexes sont déstabilisés par une incubation dans le tampon de migration (Fermentas) + 10% d'acide 3-hydroxy-alpha-mercapto-beta-methylcinnamic (Sigma-Aldrich) pendant 45 minutes à 37°C. Les lysats migrent par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 7,5% en présence de sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE). Les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Roche) qui est ensuite bloquée durant la nuit (4°C) avec du PBS-TWEEN

(Rockland) 0,2% contenant 1% de BSA. Elle est ensuite incubée pendant 60 minutes avec un premier anticorps de souris anti-Myc monoclonal 9E10 dilué 1:10 dans du PBS-TWEEN 0,2%. Suivant les 4 lavages avec du PBS-TWEEN 0,2%, la membrane est mise en présence d'un anticorps anti-souris couplé à la peroxydase (1:5000) (Jackson) et incubée 60 minutes. Quatre autres lavages sont nécessaires. La révélation se fait à l'aide du kit Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche) et d'un film Kodak BioMax XAR. sNRP1wt et les mutants sont détectés à l'aide d'un anticorps de souris anti-HA 12CA5 et d'un deuxième anticorps couplé à la peroxydase. L'immunobuvardage de type Western s'effectue de la même façon que ci-haut.

Production de pseudotypes HTLV-2 et infection

Les pseudotypes viraux MLV possédant l'enveloppe virale de HTLV-2 ou A-MLV ont été produits par transfection des vecteurs MLV- Δ Env, HTLV-2-Env ou A-MLV-Env et Ψ LacZ dans des cellules HEK293T comme décrit précédemment (204). Les pseudotypes furent recueillis 24h post-transfection et filtrés sur un filtre Acrodisc 25mm Sering filter de 0,45 μ m (Pall Corporation). Ces virions ont été utilisés afin d'infecter des cellules exprimant de façon transitoire NRP1. Brièvement, 10⁶ cellules HEK293T ont été mises en culture et transfectées avec 3 μ g de pSecTagA-NRP1 de type sauvage ou par le vecteur contrôle pCDNA3. 24h post-transfection, ces cellules furent infectées par 1mL de pseudotypes HTLV-2 ou A-MLV, fraîchement recueillis. 48h post-infection, les cellules ont été fixées et l'activité de la β -galactosidase fut quantifiée à l'aide d'un test au 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside ou X-Gal (205). La β -galactosidase hydrolyse le substrat X-Gal pour produire du galactose et le 4-chloro-3-bromo-indigo. Ce dernier forme un précipité de couleur bleu intense dans les cellules. Brièvement, les cellules ont été fixées à l'aide d'une solution de PBS contenant 0,5% de glutaraldéhyde (5 minutes à température ambiante). Les cellules ont ensuite été incubées avec une solution contenant 200 μ g/mL de X-Gal (Fermentas), 4mM de ferricyanure de potassium ($K_3F(CN)_6$), 4mM de

ferrocyanure de potassium ($K_4F(CN)_6$), 2mM de dichloromagnésium ($MgCl_2$). L'incubation se fait à 30°C pour la nuit. Les cellules bleues sont ensuite comptées à un grossissement de 50X (photographies) ou 100X (comptage).

Préparation du plasmide d'expression portant le provirus du VIH-1_{89.6}

La préparation des plasmides d'expression portant les provirus du VIH-1 est une étape délicate. Afin d'éviter la délétion de segments du provirus viral, les préparations bactériennes doivent être cultivées dans 50mL de Luria Broth, à 30°C, pendant 36 heures, avec agitation de 120rpm et aération. Le vecteur p89.6 (145, 206, 207) (NIH AIDS Research and Reference Program. Division of AIDS, NIAID, NIH), isolé et purifié par midi prep (Wisent), a été analysé par restriction enzymatique (*AgeI*) afin de s'assurer de son intégrité.

Production de particules virales VIH-1_{89.6}

5.5×10^6 cellules Hela P4 ont été mises en culture dans des flacons de culture 75cm² et transfectées avec 25µg de provirus VIH-1_{89.6}. Les surnageants contenant les virus ont été récoltés 48h post-transfection et filtrés (aliquots de 1mL, congelé à -80°C avant utilisation). Des cellules U373MG X4.15 et U373MG R5.3 ont été infectées avec des dilutions croissantes de virus afin de doser l'infectivité de celui-ci. Les dilutions optimales de virus pour l'infection des cellules U373MG X4.15 et U373MG R5.3 sont 1:100 et 1:64 respectivement. Ces concentrations correspondent à 90% de l'infection maximale et fournissent la sensibilité nécessaire pour les tests antiviraux subséquents.

Test d'inhibition de l'infection par VIH-1_{89.6}

Les molécules EGCG, TD, TM, 446, 693, 446 et RK2 proviennent de 2 banques commerciales de composés : Chembridge (San Diego, CA, USA) et MicroSource Discovery (Gaylordsville, CT, USA). Les cellules U373MG X4.15 et U373MG R5.3 ont été mises en culture dans des plaques 96 puits. Le jour

suivant, les molécules ont été mises en présence des deux types cellulaires 15 minutes avant l'infection (duplicata, 20 μ M dans du DMEM complet). La concentration des molécules varie de 78,125nM à 20 μ M (dilutions en séries 1:2). 100 μ L de VIH-1_{89,6} a été ajouté dans chacun des puits à des dilutions telles que présentées ci-haut. Les cellules ont été lysées 48h post-infection dans un tampon composé de 0,2% Triton-X100 (VWR) et de PBS, pour être ensuite congelées à -20°C afin de briser les noyaux. L'activité de la β -galactosidase fut quantifiée à l'aide d'un test au chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG). Cette molécule sert de substrat à la β -galactosidase qui la convertit en galactose et chlorophénol rouge, un chromophore produisant une couleur rouge foncé. Brièvement, 100 μ L d'une solution de CPRG 2X contenant 0,412mM de CPRG (Roche), 0,2% de Triton-X100 et 0,1% d'acide 3-hydroxy-alpha-mercapto-beta-methylcinnamic dans du PBS, a été ajouté au lysat cellulaire. Les lysats sont incubés à 30°C pendant 4 heures. Le chlorophénol rouge est dosé à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 570nm.

**3. RÉSULTATS ET DISCUSSION SUR LA
CARACTÉRISATION DU DOMAINE D'INTERACTION
ENTRE LA NEUROPILINE-1 ET HTLV-1 SU.**

La première partie de notre étude porte sur la caractérisation de NRP1 en tant que co-facteur à l'entrée de HTLV-1. Nous voulions d'abord mesurer l'impact de l'expression de NRP1 sur l'infection d'une cellule cible infectée par des pseudotypes HTLV-2. Ce système est efficace pour étudier l'entrée de virions libres, surtout lorsque la production et l'infectivité des particules virales de type sauvage est faible, comme c'est le cas pour HTLV-1 (68). De plus, le partage du même récepteur d'entrée pour HTLV-1 et HTLV-2 (97) nous permet d'extrapoler nos résultats obtenus pour les pseudotypes portant l'enveloppe de HTLV-2. Notre deuxième objectif était d'identifier le domaine extracellulaire de NRP1 responsable de l'interaction avec la protéine d'enveloppe de HTLV-2. Nous avons donc introduit des mutations de délétion dans les différents domaines du récepteur de type sauvage et soluble. Ces mutants ont ensuite été caractérisés par cytométrie en flux ou par immunobuvardage de type Western. Une fois caractérisés, les mutants solubles ont été utilisés dans une étude de coimmunoprécipitation afin d'identifier un ou des domaines de NRP1 responsables de l'interaction avec HTLV-1 SU. Nous voulions identifier un mutant qui perdait la capacité à lier cette protéine virale.

3.1 L'EXPRESSION DE NRP1 À LA SURFACE CELLULAIRE FAVORISE L'ENTRÉE DE PSEUDOTYPES HTLV-2

Un des problèmes techniques majeurs lors de l'étude de l'entrée de HTLV-1 est le faible niveau d'infectivité des particules virales. Cette particularité, qui est due à l'inefficacité de la maturation du précurseur d'enveloppe gp61, s'applique à HTLV-1 mais pas à HTLV-2. Comme ces rétrovirus semblent partager le même récepteur d'entrée (97), l'utilisation de particules virales possédant l'enveloppe de HTLV-2 permet de surmonter cette contrainte.

Dans notre étude, le premier objectif était de mesurer l'impact de l'expression de NRP1 sur l'infection de cellules cibles par HTLV-1. Nous avons donc produit des pseudotypes viraux composés des protéines de structure et enzymes du virus de la leucémie murine (MLV) et des protéines d'enveloppe de HTLV-2 ou A-MLV (85). Ces particules virales possèdent également le gène rapporteur *lacZ* codant pour la β -galactosidase. A-MLV, qui infecte la majorité des lignées cellulaires, est utilisé comme contrôle positif à l'infection. Ce virus utilise le transporteur de phosphate Na^+ -dépendant Pit-2 comme récepteur (59, 60).

Les figures 3.1A et B montrent que les cellules transfectées avec NRP1 sont plus sensibles à l'infection par les pseudotypes HTLV-2 que les cellules transfectées avec le plasmide contrôle pCDNA3, à un ratio de 1,88 fois. Ce ratio a été mesuré en faisant la moyenne du nombre de cellules exprimant la β -galactosidase (cellules bleues) pour 5 champs de vision. Le taux d'infection des pseudotypes A-MLV est constant entre les cellules exprimant ou non NRP1. Ceci démontre que l'augmentation de l'infection par les pseudotypes HTLV-2, décrite ci-haut, est due à l'expression de NRP1 et non à l'enveloppe virale. Ces résultats sont consistants avec les travaux de nos collaborateurs qui obtinrent une augmentation de l'infection par les pseudotypes HTLV-2 d'environ 2,2 fois dans les cellules surexprimant NRP1 (100).

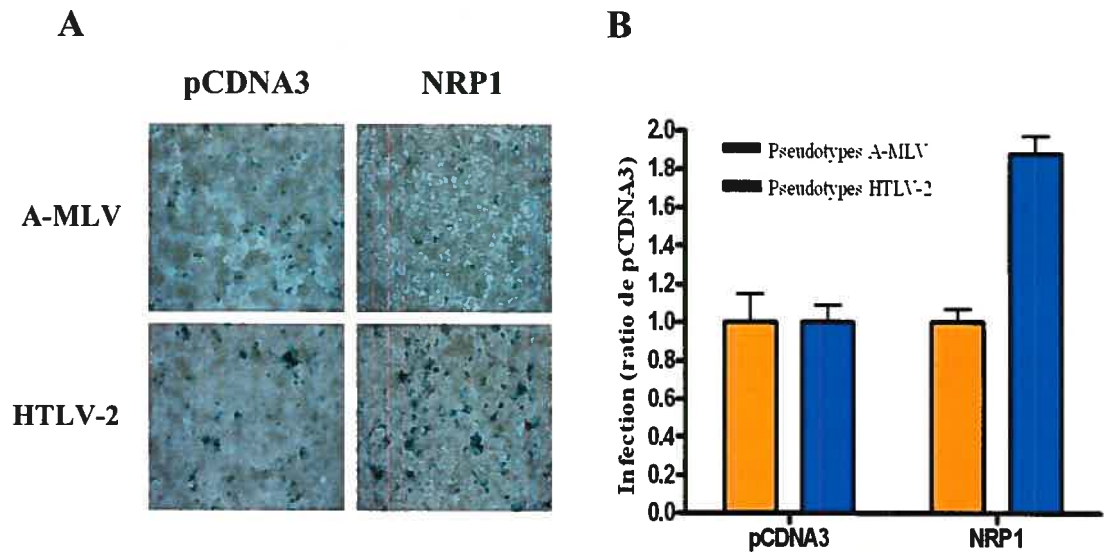


Figure 3.1 NRP1 est impliquée lors de l'entrée des pseudotypes HTLV-2. Des pseudotypes viraux MLV portant l'enveloppe de HTLV-2 ou A-MLV ont été utilisés afin d'infecter des cellules HEK293T transfectées ou non avec NRP1. **(A)** Les cellules bleues correspondent aux cellules infectées par les pseudotypes portant l'enveloppe A-MLV ou HTLV-2 (grossissement 50X). **(B)** L'effet de la surexpression de NRP1 sur l'infection de cellules HEK293T par des pseudotypes HTLV-2 a été quantifié en comptant le nombre moyen de cellules exprimant la β -galactosidase pour 5 champs de vision. Les résultats sont exprimés en nombre relatif de cellules transfectées par NRP1 qui ont été infectées par les pseudotypes A-MLV ou HTLV-2 en fonction du nombre de cellules transfectées par pCDNA3 qui ont été infectées par ces mêmes pseudotypes.

3.2 CONSTRUCTION DES MUTANTS DE LA NEUROPILINE-1 DE TYPE SAUVAGE (NRP1) ET SOLUBLE (sNRP1).

Nous avons poursuivi l'étude de l'entrée virale de HTLV-1 via le récepteur NRP1 en caractérisant le domaine de ce récepteur responsable de l'interaction avec la protéine d'enveloppe SU de HTLV-1. Pour ce faire, nous avons fait des mutations de délétion par la méthode de Kunkel (202) des domaines extracellulaires de NRP1. Les domaines délétés sont les suivants : a1 (acides aminés 27 à 141), a2 (147-265), a (27-265), b (271-583) et c (645-811). La figure 3.2A représente les mutants de sNRP. Les masses moléculaires attendues pour ces mutants sont : $\Delta a1=105\text{kDa}$, $\Delta a2=100\text{kDa}$, $\Delta a=85\text{kDa}$, $\Delta b=75\text{kDa}$ et $\Delta c=95\text{kDa}$. Les mutants de NRP1 possédant le domaine TM, représentés à la figure 3.2B, ont été obtenus en insérant l'ADN complémentaire codant pour le domaine transmembranaire dans les plasmides codant pour les mutants de sNRP1. Cette insertion a mené à la perte des épitopes immunologiques cMyc et His₆.

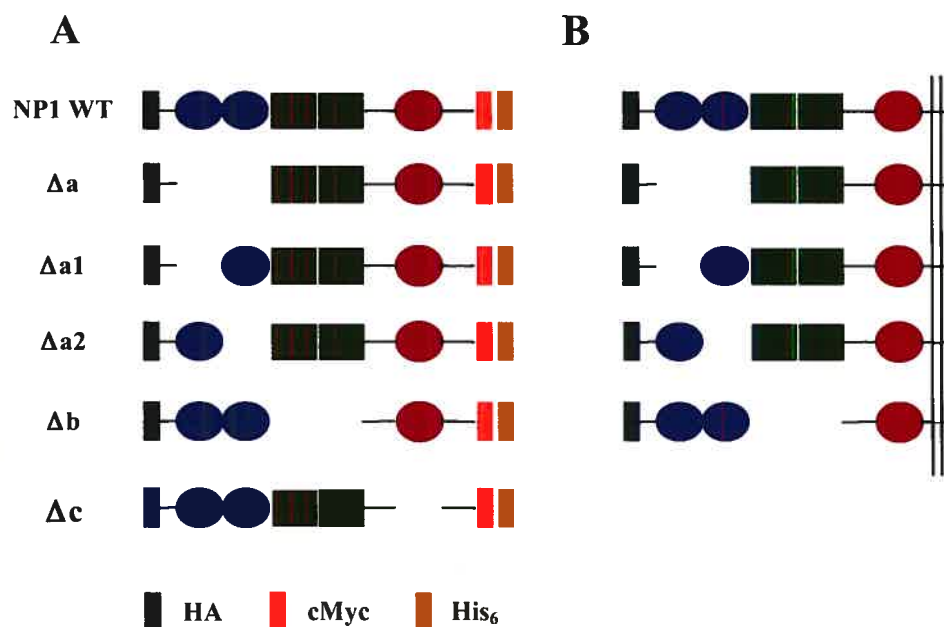


Figure 3.2 Schéma des différents mutants NRP1. La délétion des différents domaines extracellulaires de sNRP1 (**A**) a été faite par mutagenèse dirigée selon la méthode de Kunkel. Les mutants sont sNRP1 $\Delta a1$ (acides aminés 27 à 141), $\Delta a2$ (147-265), Δa (27-265), Δb (271-583) et Δc (645-811). **B)** Les mutants du récepteur NRP1 ont été créés en clonant le domaine transmembranaire dans les vecteurs d'expression codant pour les mutants solubles $\Delta a1$, $\Delta a2$, Δa et Δb .

3.3 DÉTECTION DES MUTANTS DE NRP1 À LA SURFACE CELLULAIRE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

Les niveaux d'expression des mutants du récepteur WT ont été quantifiés par cytométrie en flux. Nous avons utilisé l'anticorps monoclonal 12CA5 suivi d'un deuxième anticorps couplé à la fluorescéine. Premièrement, les résultats montrent que l'augmentation de la quantité de NRP1 transfectée résulte en une augmentation du niveau de détection de NRP1 à la surface cellulaire (figure 3.4a). Les voies de traduction de protéines et de transport à la surface cellulaire ne sont donc pas saturées. Deuxièmement, l'expression relative des mutants de NRP1 à la surface cellulaire est représentée à la figure 3.3b. Nous avons transfecté 2µg d'ADN codant pour NRP1 et les mutants. La délétion des différents domaines extracellulaires de NRP1 n'a pas d'effet sur la détection du récepteur à la surface cellulaire. De plus, leur densité est comparable à celle du récepteur NRP1 sauvage, ce qui suggère ici encore que la voie de production des protéines n'est pas saturée. Ces expériences (figures 3.4 a et b) n'ont été fait qu'une fois.

Les différents mutants sont présentement utilisés par nos collaborateurs, le Dr Claudine Pique (Hôpital Saint-Louis, Paris, France) et le Dr Kathryn S. Jones (SAIC-Frederick, Frederick, MD, USA). Ils s'intéressent à l'impact de l'expression de ces mutants à la surface d'une cellule sur le niveau d'infection de HTLV-1. Cette étude est présentement en cours.

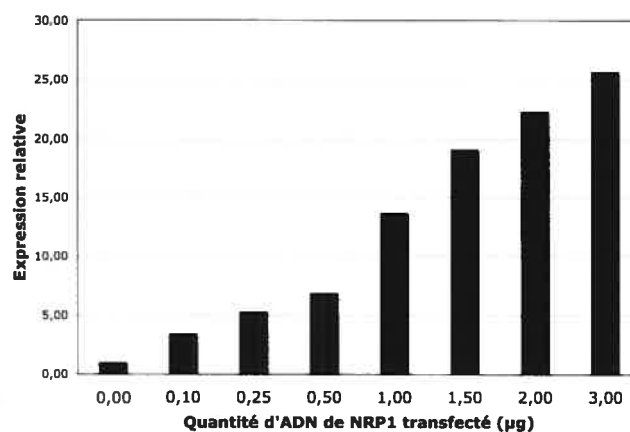
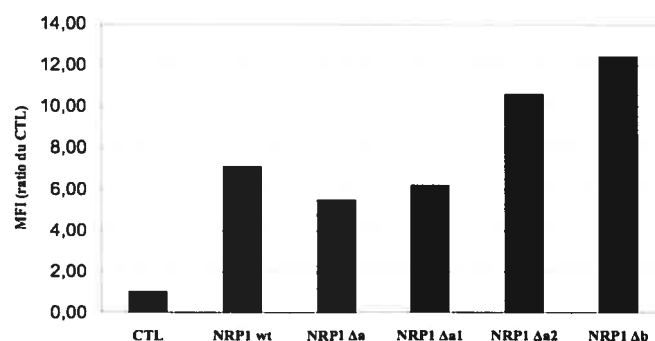
A**B**

Figure 3.3 Expression à la surface cellulaire de NRP1 et des mutants $\Delta a1$, $\Delta a2$, Δa et Δb . Des cellules HEK293T ont été transfectées avec 0, 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ou 3,0µg de NRP1 (A) ou avec 2µg de NRP1 ou mutant (B). L'expression en surface cellulaire a été détectée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-HA 12CA5 suivi d'un anticorps couplé à la fluorescéine (GAM-FITC). La densité des récepteurs a été déterminée grâce à la cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en fluorescence relative par rapport au contrôle pCDNA3. CTL = contrôle ; MFI = intensité moyenne de fluorescence (MFI).

3.4 CARACTÉRISATION DES MUTANTS DE sNRP1 PAR IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN

Les mutants de sNRP1 ont été caractérisés par immunobuvardage de type Western. Les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide contrôle pCDNA3, sNRP1 ou les mutants a, a1, a2, b ou c. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 7,5% dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Elles furent ensuite transférées sur une membrane de polyvinyle et détectées à l'aide d'un premier anticorps monoclonal anti-HA 12CA5 et d'un deuxième anticorps couplé à la peroxydase.

La figure 3.4A montre l'expression de sNRP1 et des mutants Δa , $\Delta a1$, $\Delta a2$, Δb et Δc (pistes 2 à 7). sNRP1 de type sauvage migre à une masse moléculaire de 115kDa (piste 2), 25kDa de moins que le récepteur de type sauvage (105). Les mutants $\Delta a1$ (piste 4) et $\Delta a2$ (piste 5) migrent à une masse moléculaire de 110 et 100kDa respectivement. Le mutant Δb possède une masse moléculaire d'environ 70kDa (piste 6) alors que le mutant Δc migre à un poids moléculaire d'environ 100kDa (piste 7). Dans toutes ces pistes, deux bandes sont retrouvées à 80 et 90kDa. Ces deux bandes sont également retrouvées dans les lysats des cellules transfectées avec le plasmide contrôle pCDNA3 (piste 1). Il s'agit donc de protéines cellulaires reconnues de façon non spécifique par l'anticorps monoclonal anti-HA 12CA5. Ces deux bandes rendent difficile l'identification des bandes correspondant aux mutants $\Delta a1$, $\Delta a2$ et Δc puisque ces dernières sont attendues dans cette région. Pour contrer cet inconvénient, la membrane de polyvinyle fut lavée des anticorps 12CA5 qui y ont été fixés (« stripping ») et les protéines furent de nouveau détectées à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-cMyc 9E10. La figure 3.4B montre l'expression de sNRP1 et des mutants $\Delta a1$, $\Delta a2$, Δb et Δc (pistes 2, 4 à 7). L'anticorps 9E10, comparativement à l'anticorps 12CA5, ne détecte pas les protéines à 80 et 90kDa. L'identification des mutants $\Delta a1$, $\Delta a2$, et Δc est alors plus facile. La figure 3.4B montre également que la construction du

mutant Δa utilisée lors de cette première expérience n'est pas bonne. En effet, aucune protéine n'est détectée dans la piste correspondant à ce mutant (piste 4). Nous avons donc repris la construction de ce mutant par mutagenèse dirigée et nous l'avons caractérisée de nouveau par immunobuvardage de type Western (Figure 3.4C). Nous avons utilisé l'anticorps anti-HA 12CA5 pour détecter sNRP1 et le mutant Δa . Ce dernier résultat montre que le mutant Δa possède un poids moléculaire de 80kDa (indiqué par la flèche rouge). Les bandes non spécifiques retrouvées à la figure 3.4A sont également présentes à la figure 3.4C. La détection du mutant Δa n'a pas été effectuée à l'aide de l'anticorps anti-cMyc 9E10. Les masses moléculaires obtenues pour les mutants, suite au SDS-PAGE et à l'immunobuvardage de type Western, sont équivalentes à celles attendues.

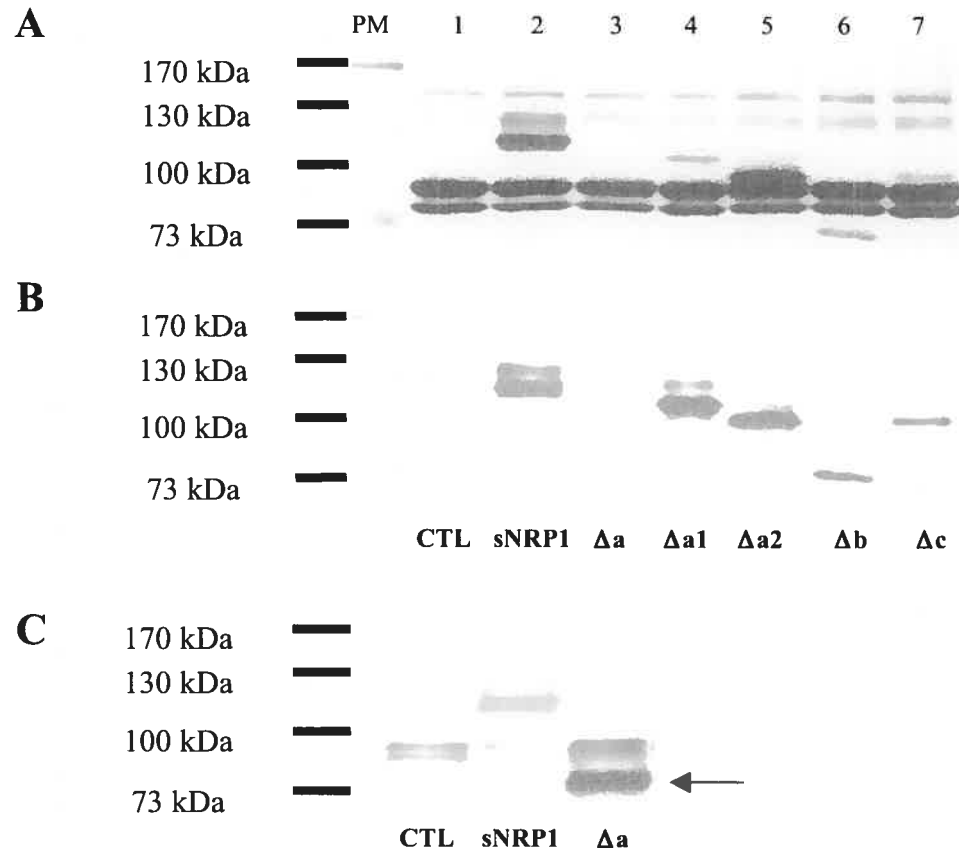


Figure 3.4 Caractérisation des mutants a1, a2, b et C de sNRP1 par immuobuvardage de type Western. **A)** Des cellules HEK293T ont été transfectées avec pCDNA3 (piste 1), sNRP1 (piste 2) ou les mutants Δa , $\Delta a1$, $\Delta a2$, Δb et Δc (pistes 3 à 7 respectivement). Les protéines furent séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Elles furent ensuite transférées sur une membrane de polyvinyle et sNRP1 fut détectée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-HA 12CA5. **B)** La membrane de polyvinyle fut lavée des anticorps fixés et sNRP1 et les mutants furent détectés de nouveau avec un anticorps anti-cMyc 9E10. **C)** Le mutant Δa a été caractérisé par la même méthode. La détection de sNRP1 a été faite à l'aide d'un anticorps anti-HA 12CA5. La flèche rouge indique la bande correspondant au mutant Δa .

3.5 sNRP1 ET LES MUTANTS INTERAGISSENT AVEC LA PROTEINE D'ENVELOPPE SU DE HTLV-1 DANS LA VOIE DE SECRETION

Les protéines d'enveloppe virale et les récepteurs d'entrée peuvent former des complexes intracellulaires dans la voie de sécrétion (208-210). Nous avons donc utilisé la technique de co-immunoprécipitation pour déterminer si les mutants de sNRP1 formaient toujours ce type de complexe. Des cellules HEK293T ont été co-transfectées avec le plasmide codant pour la protéine d'enveloppe virale HTLV-1 SU et avec le plasmide codant pour sNRP1 ou les mutants. Comme contrôle pour mesurer le bruit de fond détecté par l'anticorps anti-HA 12CA5 lors de l'immunobuvardage de type Western, nous avons transfecté le plasmide pCDNA3 seul. Le plasmide CMV-HTLV-1-Env-Stop (81, 100) fut co-transfecté avec sNRP1 afin de servir de contrôle négatif pour l'expression de Env. Ce plasmide possède un codon d'arrêt de traduction en amont du gène *env*. Les complexes intracellulaires HTLV-1 SU-sNRP1 ont été précipités à l'aide d'un pool de sérum de patients infectés. sNRP1 et les mutants ont ensuite été détectés par SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western dirigé contre l'épitope HA (anticorps 12CA5). sNRP1 n'est détectée que si elle interagit avec la protéine virale SU. La bande non spécifique à 90kDa (Figure 3.5 piste 1 à 8), due à une reconnaissance non spécifique de l'anticorps 12CA5, nuira pour la détection des mutants $\Delta a1$, $\Delta a2$, Δc .

sNRP1 forme un complexe intracellulaire avec la protéine d'enveloppe virale SU de HTLV-1 lorsque ces 2 protéines sont exprimées dans la même cellule (Figure 3.5 piste 3). sNRP1 est détectée à un poids moléculaire de 115kDa, tout comme dans l'expérience précédente (Figure 3.4). L'interaction entre sNRP1 et HTLV-1 SU est spécifique puisque sNRP1 ne précipite pas lorsqu'elle est co-transfectée avec le vecteur contrôle CMV-HTLV-1-Env-Stop (piste 2). Dans notre système expérimental, les protéines sNRP1 et SU sont tous deux retrouvées dans la voie de sécrétion sous forme soluble. Le domaine extracellulaire de NRP1 est

donc nécessairement responsable de l'interaction avec l'enveloppe virale de HTLV-1.

Une fois l'interaction entre sNRP1 et HTLV-1 SU démontrée, nous nous sommes intéressés à cette même interaction mais cette fois, en étudiant les mutants de délétion du récepteur. Nous étions à la recherche d'un mutant qui aurait perdu la capacité de former des complexes intracellulaires avec l'enveloppe virale. La figure 3.5 montre clairement que l'absence des domaines a (piste 4) ou b (piste 7), n'a pas d'effet sur la capacité de sNRP1 à interagir avec HTLV-1 SU. On retrouve ces deux mutants aux poids moléculaires attendus, soit environ 80kDa pour Δa et 70kDa pour Δb . On voit ici encore les bandes non spécifiques reconnues par l'anticorps 12CA5 à 90kDa. Le mutant Δc est attendu à une masse moléculaire de 100kDa, tel que déterminée par la caractérisation des mutants (Figure 3.4A et B, piste 7). La bande non spécifique est problématique pour l'identification du mutant Δc . On peut remarquer une double bande vers 100kDa. La bande du bas correspondrait à la bande non spécifique alors que celle du haut pourrait correspondre au mutant Δc . L'absence de ce domaine n'aurait donc pas d'impact sur l'interaction entre sNRP1 et SU.

Les pistes 5 et 6 correspondent aux mutants $\Delta a1$ et $\Delta a2$ respectivement. Tout comme pour le mutant Δc , la bande non spécifique est encombrante pour l'identification de ces mutants. Une double bande est observée pour le mutant $\Delta a1$ (piste 5). Ici encore, la bande du bas correspondrait à la bande non spécifique alors que celle du haut correspondrait au mutant $\Delta a1$. Dans un tel cas, l'absence du domaine a1 n'aurait pas d'impact sur la liaison de sNRP1 à HTLV-1 SU. Le mutant $\Delta a2$ quant à lui est indétectable (piste 6). Il est possible qu'il soit présent, mais que la bande non spécifique ne permet pas de l'identifier. Une augmentation du temps de migration aurait permis de séparer davantage la bande non spécifique de celle correspondant au mutant $\Delta a2$. Nous aurions pu faire également un deuxième marquage avec l'anticorps anti-cMyc (« stripping ») afin de contrecarrer la reconnaissance non spécifique de l'anticorps anti-HA 12CA5. Cette expérience

a d'ailleurs été utilisée lors de la caractérisation des mutants de sNRP1 (Figure 3.4B).

Il serait surprenant que l'absence du domaine a2 empêche la liaison de l'enveloppe virale à sNRP1. En effet, la délétion du domaine a, implique la perte des deux sous-domaines a1 et a2. Ceci signifierait que le sous-domaine a2 serait nécessaire pour l'interaction alors que le domaine a, n'aurait pas d'impact sur la liaison à HTLV-1 SU. Selon notre interprétation, il s'agit sûrement d'un chevauchement entre la bande non spécifique et la bande correspondant au mutant $\Delta a2$ (Figure 3.5 piste 6). Ces expériences devraient donc être approfondies afin de déterminer l'implication exacte des domaines a, a1 et a2.

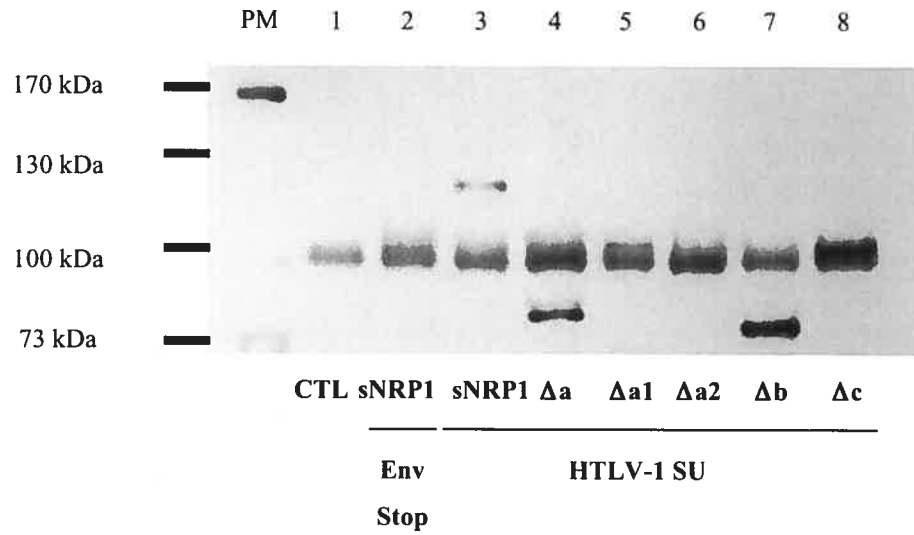


Figure 3.5 sNRP1 et les mutants forment des complexes intracellulaires avec la protéine SU de HTLV-1. Des cellules HEK293T ont été transfectées avec pCDNA3 (ligne 1), co-transfectées avec sNRP1 et CMV-HTLV-1-Env-Stop (ligne 2) et co-transfectées avec sNRP1 ou mutants et CMV-HTLV-1-SU (lignes 3 à 8). HTLV-1 SU a été précipité à l'aide d'un pool de sérum de patients infectés par HTLV-1. sNRP1 a été détectée avec l'anticorps monoclonal anti-HA 12CA5.

3.6 DISCUSSION

Notre premier objectif était d'évaluer le rôle de NRP1 lors de l'entrée de HTLV-1 dans une cellule cible. Nous avons donc mis au point un système d'infection impliquant des particules virales MLV possédant l'enveloppe de HTLV-2. L'utilisation de pseudotypes HTLV-2 a été préférée aux virions libres HTLV-1 puisque ces derniers très sont peu infectieux *in vitro* (68). Ces rétrovirus partageraient également le même récepteur d'entrée (97). Nos résultats montrent que les cellules HEK293T transfectées avec NRP1 sont 1,88 fois plus susceptibles à l'infection par les pseudotypes HTLV-2 que les cellules contrôles. Cette faible augmentation de l'infection peut s'expliquer en partie par un niveau d'expression endogène élevé du récepteur dans ce type cellulaire. La densité de récepteurs à la surface cellulaire serait suffisamment élevée pour permettre l'entrée du virus. Dans cette étude, nous avons démontré qu'il était possible de surexprimer NRP1 dans les cellules HEK293T. Une augmentation de la concentration de NRP1 à la surface de ce type cellulaire n'a toutefois que peu d'impact sur l'infection par les pseudotypes HTLV-2. On ne peut quantifier le niveau de NRP1 endogène, il est donc impossible de mesurer l'impact de NRP1 recombinant. Si la quantité stœchiométrie de NRP1 recombinant et endogène est la même, une augmentation de l'infection de 2 fois est plus ou moins attendue.

Nos collaborateurs ont étudié l'impact d'une diminution de l'expression endogène de NRP1 à la surface des HEK293T sur le niveau d'infection des pseudotypes HTLV-2. Ils ont démontré qu'une diminution relative de l'expression du récepteur à l'aide de siRNA permettait de diminuer jusqu'à 50% le taux d'infection des pseudotypes HTLV-2 (100). La permissivité des cellules HEK293T à l'infection par les pseudotypes HTLV-2 pourrait également s'expliquer par la présence de GLUT-1 à la surface de ces cellules (85), même si son rôle dans l'entrée n'est pas encore bien caractérisé. Ainsi, l'expression endogène de NRP1 et GLUT-1 dans ces cellules a pour effet d'élever le niveau basal d'infection, diminuant la sensibilité du test. L'ensemble de ces résultats

suggèrent fortement que NRP1 pourrait être un facteur ou un co-facteur à l'entrée des pseudotypes HTLV-2, et par extrapolation, à l'entrée de HTLV-1.

Nous avons poursuivi cette étude en tentant de déterminer, au niveau moléculaire, la nature de l'interaction entre NRP1 et la protéine d'enveloppe de HTLV-1. Nous avons produit des mutants de délétion pour les domaines extracellulaires a, a1, a2, b et c de sNRP1, que nous avons caractérisés par immunobuvardage de type Western. La formation de complexes intracellulaires entre HTLV-1 SU et les mutants de sNRP1 fut ensuite étudiée par co-immunoprécipitation. Notre objectif était d'identifier un mutant qui n'interagissait plus avec l'enveloppe virale. Nos résultats ont démontré que tous nos mutants de sNRP1 semblent interagir avec HTLV-1 SU lorsque ces protéines sont co-exprimées dans la même cellule. Ceci suggère que plus d'un domaine pourrait lier indépendamment l'enveloppe de HTLV-1. Il serait également possible que les domaines non supprimés de sNRP1 soient responsables de cette interaction. En effet, les résidus entre l'épitope HA et le domaine a1 (6 acides aminés), entre les domaines b et c (62 acides aminés) et entre le domaine c et l'épitope cMyc (49 acides aminés) sont présents chez tous les mutants. Il serait intéressant de construire des mutants supplémentaires portant des délétions pour ces régions afin d'évaluer leur implication dans l'interaction avec HTLV-1 SU.

La détection de tous les mutants de sNRP1 après la co-immunoprécipitation avec la protéine SU de HTLV-1 pourrait s'expliquer par la capacité de ce récepteur à former des dimères à la surface cellulaire. En effet, Giger et al. ont suggéré que NRP1 pouvait être retrouvée sous la forme d'un homodimère (110). Dans cette dernière étude, l'utilisation de mutants de NRP1 portant des délétions pour les différents domaines extracellulaires n'a pas permis d'identifier le domaine responsable de l'homodimérisation. Les domaines transmembranaire et cytosolique quant à eux ne semblent pas nécessaire pour la dimérisation. Ils ont donc suggéré que plus d'un domaine extracellulaire de NRP1 pourrait être impliqué dans ce processus. Notre étude de co-immunoprécipitation

aurait pu impliquer la formation d'un complexe protéique ternaire, formé d'un monomère de NRP1 endogène, d'un mutant de NRP1 soluble et de la protéine virale SU. Ainsi, un récepteur NRP1 endogène aurait pu lier à la fois SU et un mutant de NRP1 soluble. Un mutant de NRP1, qui ne pourrait plus lier l'enveloppe de HTLV-1, pourrait quand même se retrouver dans ce complexe. Il pourrait également être co-immunoprécipité à l'aide d'un anticorps dirigé contre HTLV-1, même s'il n'interagit pas directement avec l'enveloppe de celui-ci. Toutefois, cette hypothèse n'est valable que si un monomère de NRP1 est suffisant pour la liaison avec l'enveloppe de HTLV-1. Autrement, un dimère formé de NRP1 endogène et d'un mutant du récepteur soluble, dont le domaine délété est responsable de l'interaction avec HTLV-1 SU, ne pourrait pas lier cette protéine virale.

La caractérisation moléculaire de l'interaction entre NRP1 et HTLV-1 Env pourrait se poursuivre en purifiant les domaines extracellulaires solubles du récepteur. Nous pourrions créer des mutants de délétion dans le vecteur pSecTagA-sNRP1 de tel sorte qu'il ne conserverait que les différents domaines extracellulaires recombinants. Il serait ainsi possible de produire, individuellement, les différents domaines solubles possédant l'épitope immunologique His₆. Cet épitope permettrait la purification par chromatographie des domaines recombinants. Ceux-ci pourraient être utilisés, dans un premier temps, comme agents antiviraux dans une étude d'inhibition de l'infection de HTLV-1. Cette étude est d'ailleurs en cours dans les laboratoires du Dr Claudine Pique et du Dr Kathryn S. Jones. Une telle approche d'ailleurs a été utilisée afin de bloquer l'interaction entre l'enveloppe du VIH-1 et son récepteur CD4 (211). Les domaines recombinants de NRP1 pourraient également être utilisés dans une étude de co-immunoprécipitation afin de déterminer s'ils interagissent avec HTLV-1 SU. Il serait ainsi possible d'affiner le domaine d'interaction entre NRP1 et HTLV-1, passant des domaines recombinants à des peptides de quelques acides aminés. Finalement, ces peptides pourraient être testés dans un contexte antiviral. L'inhibition de l'infection par ces peptides nécessite la liaison directe de ceux-ci à

la protéine virale SU. Il est donc primordial que la séquence du gène viral *env* soit conservée au sein des différents isolats viraux pour qu'une telle approche soit envisageable d'un point de vue thérapeutique. HTLV-1 répond à ce critère (179). En effet, une étude phylogénétique de Capdepon et al. a récemment démontré une importante stabilité du gène codant pour l'enveloppe de HTLV-1 (212). Ils ont observé une variation au sein de ce gène n'excédant pas 3% entre les différentes souches, sauf pour les deux souches mélanésiennes les plus distantes pour lesquelles ils notent 8% de variation. HTLV-1 peut se catégoriser selon trois sous-types selon la variabilité de leur génome entier: Cosmopolitain (sous-type A), Afrique Centrale (sous-type B) et Mélanésien (sous-type C).

L'ensemble de nos résultats, en plus de ceux de nos collaborateurs (100), suggère fortement que NRP1 soit impliquée lors de l'entrée de HTLV-1. NRP1 pourrait agir de différentes façons. Premièrement, elle pourrait jouer le rôle de protéine d'attachement pour le virus. Elle permettrait ainsi d'augmenter la concentration de virus à la surface cellulaire, favorisant la liaison de la protéine d'enveloppe virale au récepteur d'entrée. Pour qu'elle puisse être considérée comme une protéine d'attachement, NRP1 ne doit pas induire de changement de conformation fonctionnel lors de l'interaction avec la protéine virale SU. Ainsi, l'expression de NRP1 à la surface d'une cellule cible, en absence du ou des récepteurs, ne devrait pas favoriser l'infection par HTLV-1. Ce rôle serait comparable à celui joué par DC-SIGN et les HSPGs lors de l'entrée du VIH-1 (voir section 1.3.1).

Deuxièmement, NRP1 pourrait jouer le rôle de récepteur ou de corécepteur d'entrée de HTLV-1. Elle possède toutes les caractéristiques du récepteur de HTLV-1: elle est exprimée chez plusieurs lignées cellulaires de plusieurs origines, son expression est augmentée dans les lymphocytes T activés et elle est localisée à la synapse virologique (100). GLUT-1, qui possède également toutes ces caractéristiques, serait lui aussi impliqué dans l'entrée de HTLV-1 (85). Quelle serait alors l'implication de chacune de ces protéines cellulaires dans l'entrée de

HTLV-1 dans une cellule cible? Des études de co-immunoprécipitation ont démontré que ces protéines interagissaient fortement en présence de HTLV-1 Env (100). GLUT-1 et NRP1 interagissent également en absence de l'enveloppe. Ces deux protéines pourraient donc agir de concert et former un complexe ternaire de haute affinité pour HTLV-1 SU. Les HSPGs pourraient également faire partie de ce complexe. Cette caractéristique n'est pas sans rappeler le mécanisme d'entrée du VIH-1, impliquant le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 et CXCR4. L'expression ubiquitaire de NRP1 et de GLUT-1 rend toutefois ardue l'étude de la séquence des événements menant à l'entrée de HTLV-1.

Troisièmement, NRP1 pourraient agir en tant que récepteur alternatif lors de l'entrée de HTLV-1 et HTLV-2. Son expression à la surface cellulaire serait alors suffisante pour rendre une cellule permissive à l'infection par ces rétrovirus. La présence de GLUT-1 et des HSPGs sur une cellule, en plus de NRP1, augmenterait la densité et la diversité des récepteurs d'entrée, optimisant ainsi l'infection de cette cellule. Ce phénomène est observé chez le virus de l'herpes simplex (HSV). HSV utilise plusieurs récepteurs pour infecter une cellule cible. On compte parmi ceux-ci les HSPGs, HVEM, Nectin-1, Nectin-2 et la molécule du complément C3b (213). L'expression de HVEM à la surface des lymphocytes T activés permet l'entrée de HSV dans ces cellules (214), alors que l'expression de Nectin-1 favoriserait l'infection des neurones (215). L'utilisation de différents récepteurs d'entrée permet donc à un virus d'élargir son tropisme. De plus, un virus ayant subi une mutation dans sa protéine d'enveloppe qui ne lui permet plus de lier un récepteur, pourrait quand même infecter une cellule en utilisant un autre récepteur d'entrée. Récemment, une étude a identifié une lignée cellulaire glioblastomale humaine, U87, permissive à l'infection par HTLV-1, qui n'exprime que très faiblement GLUT-1 (216). Cette permissivité pourrait s'expliquer en partie par la présence de NRP1 à la surface de ces cellules (217). Il serait intéressant d'utiliser les domaines recombinants solubles de NRP1 afin d'essayer de bloquer l'infection de ces cellules par HTLV-1 en absence de GLUT-1. Ceci

nous permettrait de déterminer si GLUT-1 et NRP1 représentent des voies alternatives d'entrée.

Le rôle de GLUT-1 dans l'entrée de HTLV-1 et de HTLV-2 fut récemment mis en doute par deux études. La première suggère que les rétrovirus HTLV-1 et HTLV-2 ne partageraient pas le même récepteur d'entrée (218). Cette observation a été faite en comparant les tropismes *in vivo* et *in vitro* de ces virus. HTLV-1 infecterait préférentiellement les lymphocytes T CD4+, où l'on retrouve une forte concentration de HSPGs comparativement à GLUT-1. HTLV-2 quant à lui ciblerait plutôt les lymphocytes T CD8+, qui expriment majoritairement GLUT-1. Ces résultats supposent que GLUT-1 agirait comme récepteur pour HTLV-2 et non pour HTLV-1. La deuxième étude vint nuancer cette première hypothèse. Takenouchi et al. ont suggéré que GLUT-1 ne serait pas le récepteur responsable de l'interaction primaire avec HTLV-1 (219). Cette hypothèse est basée sur le fait que la présence de GLUT-1 à la surface d'une cellule cible n'est pas suffisante pour permettre la liaison du virus à cette cellule. Une expérience dans laquelle des cellules transfectées avec GLUT-1, à la surface desquelles les HSPGs furent éliminés à l'aide d'enzyme, suggère que la liaison de HTLV-1 SU à la surface d'une cellule dépend de la présence des HSPGs. Toutefois, l'expression de GLUT-1 à la surface de ces mêmes cellules, en présence des HSPGs, favorise l'infection par contact cellule-cellule de HTLV-1. Les auteurs suggèrent donc que GLUT-1 serait essentielle pour rendre une cellule permissive à l'infection par HTLV-1, sans être impliqué à l'étape de l'interaction entre le virus et la cellule. Ils concluent ainsi que l'entrée de HTLV-1 serait un processus séquentiel dans lequel GLUT-1 agirait comme corécepteur.

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION SUR L'INHIBITION SÉLECTIVE DE L'ENTRÉE DU VIH-1 PAR LE CORÉCEPTEUR CCR5

Récemment, des membres de l'équipe du Dr Michel Bouvier ont identifié des antagonistes de CCR5 dans une campagne de criblage à haut débit ((201) et résultats non publiés). Ces petites molécules bloquent le recrutement de la β -arrestine 2 à CCR5 suivant l'activation du récepteur par la chimiokine RANTES. Elles inhibent également le flux calcique induit par l'activation de CCR5 par RANTES. Nous nous sommes alors intéressés au pouvoir antirétroviral de ces molécules lors de l'entrée du VIH-1. Nous étions à la recherche d'un composé qui pouvait bloquer l'entrée par le corécepteur CCR5 et non par CXCR4, sans être toxique à haute concentration. Un composé reconnaissant les deux corécepteurs serait, en théorie, plus efficace. Toutefois, une telle molécule pourrait fort bien lier d'autres récepteurs cellulaires et moduler la fonction intrinsèque de ces derniers. Un agent antiviral sélectif permet donc de diminuer les risques d'effets croisés.

Afin de tester ces molécules, nous avons utilisé les lignées cellulaires rapporteuses U373MG X4.15 et U373MG R5.3, qui expriment exclusivement l'un ou l'autre des corécepteurs (199). Nous avons infecté ces 2 lignées cellulaires avec une souche virale dual tropique VIH-1_{89.6}. Le seul paramètre qui varie dans ce système est donc le corécepteur présent à la surface des cellules cibles. Le niveau d'infection a ensuite été mesuré en dosant l'activité de la β -galactosidase par un test au chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG).

4.1 INHIBITION DE L'ENTRÉE DU VIH-1 EN CIBLANT SÉLECTIVEMENT LE CORÉCEPTEUR CCR5

Les molécules TAK779, une petite molécule ciblant l'entrée par CCR5 (190) et TC14012, un peptide de 14 acides aminés ciblant l'entrée par CXCR4 (220), ont permis de mesurer l'efficacité de notre système. La figure 4.1 montre la sélectivité de chacun de ces inhibiteurs dans l'inhibition de l'entrée via CCR5 ou CXCR4. TAK779 inhibe l'entrée du VIH-1_{89.6} dans les cellules U373MG R5.3 de façon dose-dépendante, avec un IC₅₀ de 1,48nM. Cette valeur est comparable à celle observée pour l'inhibition de l'infection de virus R5 tropique VIH-1_{Ba-L} dans des cellules mononucléées extraites du sang périphérique (PBMC), qui est de 3,7nM (190). De plus, TAK779 ne possède aucun pouvoir antiviral contre le VIH-1_{89.6} lors de l'infection de cellules cibles U373MG X4.15. Cette molécule ne semble d'ailleurs pas toxique pour les cellules cibles, puisqu'une concentration élevée de TAK779 n'a pas d'effet sur la production de la β -galactosidase. Ensemble, ces résultats démontrent que l'inhibition de l'entrée du VIH-1_{89.6} par TAK779 est sélective pour le corécepteur CCR5. Notre système expérimental nous permet donc d'identifier ce type d'inhibiteur.

TC14012 quant à lui inhibe l'entrée du VIH-1_{89.6} dans les cellules cibles U373MG X4.15, sans avoir d'effet sur les cellules U373MG R5.3 (Figure 4.1). Cette molécule montre une inhibition dose-dépendante de l'infection avec un IC₅₀ de 81,2nM. Cette valeur est comparable à celle obtenue par Tamamura et al. (IC₅₀ de 20nM) (220). Ce peptide ne permet pas d'inhiber l'infection des cellules cibles U373MG R5.3, ce qui démontre sa sélectivité pour le corécepteur CXCR4. TC14012 n'est pas toxique pour les cellules puisque l'activité de la β -galactosidase est sensiblement la même en absence et à haute concentration de composé.

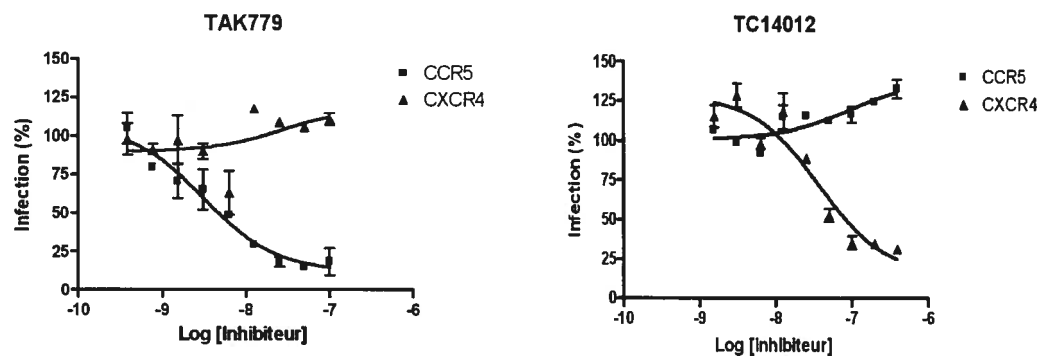


Figure 4.1 Inhibition sélective et dose-dépendante de l'infection du VIH-1_{89.6} par les composés TAK799 et TC14012. Des cellules U373MG X4.15 (▲) ou U373MG R5.3 (■) ont été infectées par VIH-1_{89.6} en présence d'une dose croissante de TAK799 ou TC14012. Le niveau d'infection a été mesuré en dosant l'activité de la β -galactosidase (CPRG). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'infection par rapport aux cellules infectées en absence d'inhibiteur.

Une fois le système expérimental validé, nous avons entrepris l'étude de l'activité antivirale des antagonistes de CCR5 identifiés par le laboratoire du Dr Michel Bouvier ((201) et résultats non publiés). Les premières molécules testées furent les extraits du thé vert, EGCG, TD et TM. La figure 4.2 montre leur potentiel antiviral contre le VIH-1_{89.6}. Ces 3 molécules inhibent de façon dose-dépendante l'infection des cellules cibles U373MG X4.15 et U373MG R5.3 par le VIH-1_{89.6}, avec des IC₅₀ variant de 0,7µM à 3,75µM. Ce pouvoir antiviral est de 1000 à 10 000 fois inférieur à celui observé pour des d'inhibiteurs d'entrée présentement en essai clinique. Maraviroc par exemple, bloque l'infection de virus dual tropique avec un IC₅₀ variant de 0,1 à 2,9nM selon la souche (196). Ces extraits du thé vert ne démontrent également aucune sélectivité quant à l'inhibition de l'entrée par les corécepteur CXCR4 ou CCR5. Il est donc impossible de conclure que ces composés inhibent l'entrée du virus. Ils pourraient agir sur d'autres étapes du cycle de réplication viral. De plus, EGCG, TD et TM ne semblent pas être toxiques pour les cellules cibles puisque l'allure des résultats montre une courbe sigmoïde. Les résultats représentant un composé toxique adopteraient plutôt l'allure d'une courbe ayant une chute abrupte précédée d'un plateau, similaire à une courbe de mortalité cellulaire (« killing curve »).

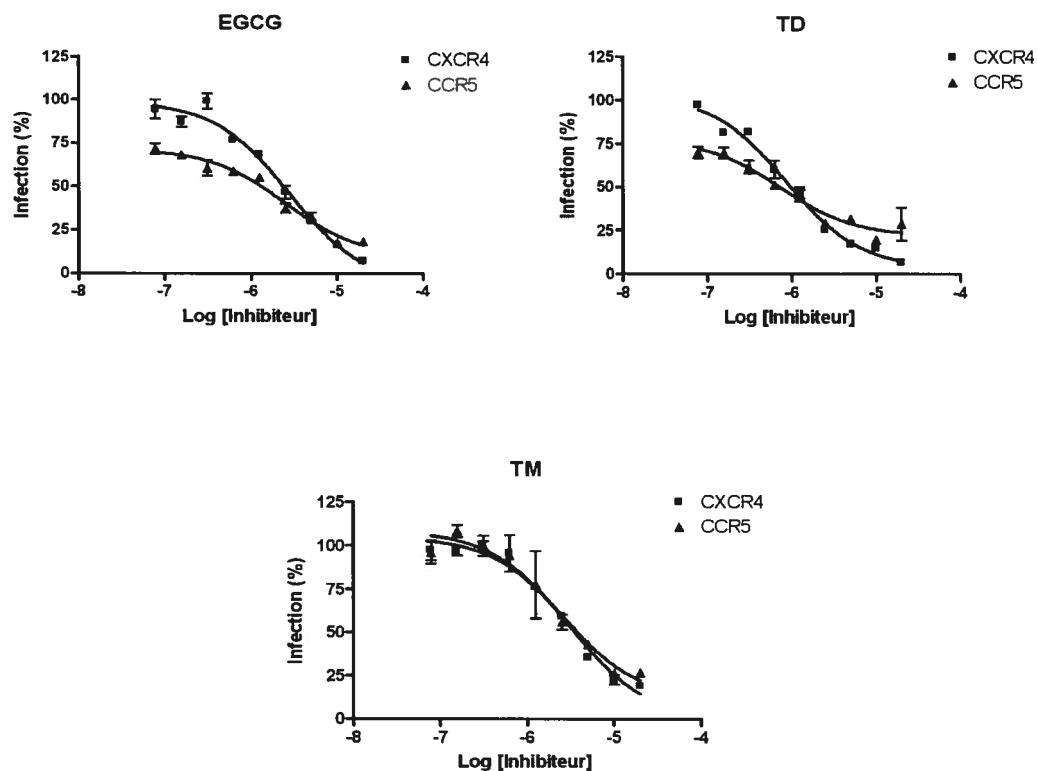


Figure 4.2 Inhibition de l'infection du VIH-1_{89.6} par les molécules du thé vert. Des cellules U373MG X4.15 (■) ou U373MG R5.3 (▲) ont été infectées par VIH-1_{89.6} en présence d'une dose croissante de EGCG, TD ou TM. Le niveau d'infection a été mesuré en dosant l'activité de la β -galactosidase (CPRG). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'infection par rapport aux cellules infectées en absence d'inhibiteur.

Nous nous sommes finalement intéressés aux petites molécules 446, RK2, 699 et 693, qui proviennent des banques commerciales Chembridge (San Diego, CA, USA) et MicroSource Discovery (Gaylordsville, CT, USA). Cette étude a d'abord permis de démontrer que les molécules 446 et RK2 inhibent l'infection des cellules cibles U373MG X4.15 et U373MG R5.3 par le VIH-1_{89.6} (Figure 4.3). La molécule 446 n'est pas sélective pour un seul corécepteur puisqu'elle inhibe de façon dose-dépendante l'infection de ces 2 types cellulaires, avec des IC₅₀ d'environ 6,75µM (U373MG R5.3) et 16,2µM (U373MG X4.15). Il est donc impossible de conclure que cette molécule bloque l'entrée du virus, bien qu'elle soit un antagoniste de CCR5. Le composé RK2 bloque lui aussi, de façon dose-dépendante, l'infection des cellules U373MG R5.3 par le VIH-1_{89.6} et ce, avec un IC₅₀ de 7µM. L'allure de la courbe pour l'infection des cellules U373MG X4.15 ressemble toutefois à une courbe de mortalité cellulaire (telle que décrite ci-haut). L'activité de la β-galactosidase chute abruptement à une concentration de RK2 d'environ 5µM. Ce composé serait donc toxique pour ces cellules cibles. Le composé 699 quant à lui n'a que très peu d'effet antiviral lors de l'infection du VIH-1_{89.6} (Figure 4.3). Il n'inhibe qu'au plus 60% de l'infection des cellules cibles U373MG R5.3 et à peine 20% de l'infection des cellules U373MG X4.15 et ce, à une concentration de 20µM.

693 est de loin la molécule la plus intéressante qui a été testée dans cette étude. Elle démontre clairement une activité antivirale contre le VIH-1_{89.6} en ciblant sélectivement l'entrée par CCR5 (Figure 4.3). Tout comme TAK799, le composé 693 inhibe l'infection par le VIH-1_{89.6} de cellules U373MG R5.3, de façon dose-dépendante, avec un IC₅₀ de 4,95µM ± 1,5 (n=3). Une concentration de 20µM permet de bloquer jusqu'à 90% de l'infection de ces cellules. Ce composé n'a aucun effet sur l'infection des cellules U373MG X4.15. De plus, la présence de 693 ne semble pas être toxique pour les cellules cibles puisque l'activité de la β-galactosidase est constante chez les cellules U373MG X4.15 infectées par le VIH-1_{89.6}. L'ensemble de ces résultats démontre que la diminution de l'activité de la β-galactosidase dans les cellules U373MG R5.3, est due à une inhibition de

l'infection et non à la toxicité de cette molécule. 693 répond donc aux critères établis dans le cadre de notre étude : 1) il possède un pouvoir antiviral contre le VIH-1, 2) il est sélectif pour le corécepteur d'entrée CCR5 et 3) il n'est pas toxique pour les cellules cibles.

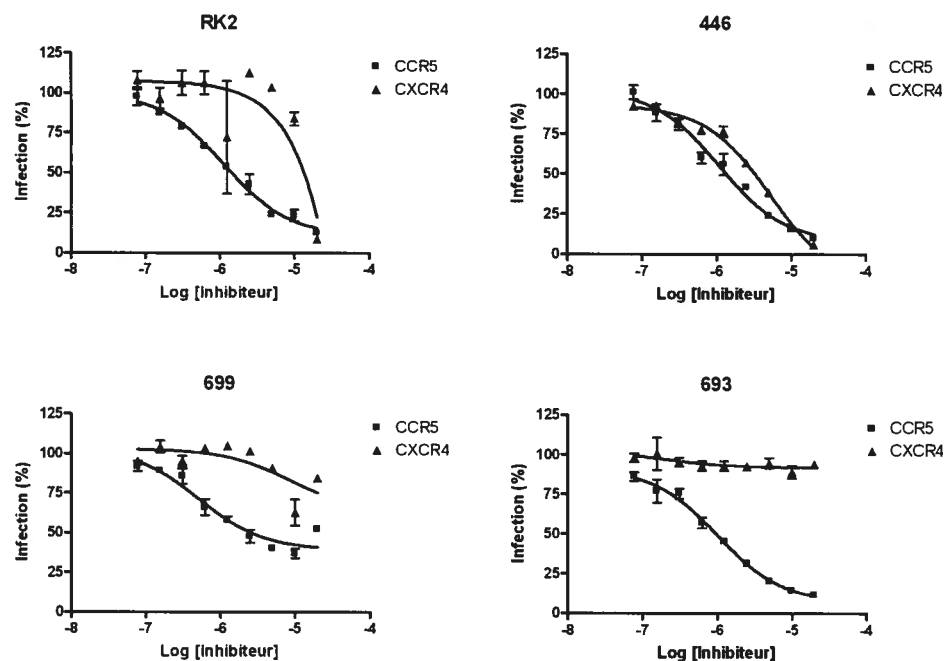


Figure 4.3 Inhibition de l'infection du VIH-1_{89.6} par les composés 446, RK2, 699 et 693. Des cellules U737MG X4.15 (▲) ou U737MG R5.3 (■) ont été infectées par VIH-1_{89.6} en présence d'une dose croissante de RK2, 446, 699 ou 693. Le niveau d'infection a été mesuré en dosant l'activité de la β -galactosidase (CPRG). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'infection par rapport aux cellules infectées en absence d'inhibiteur.

4.2 DISCUSSION

Le système expérimental que nous avons utilisé est idéal pour étudier le pouvoir inhibiteur sélectif des antagonistes de CCR5 dans l'entrée du VIH-1. Il permet à la fois de tester le pouvoir antirétroviral d'une molécule, la sélectivité pour un corécepteur d'entrée et la toxicité de cette molécule. Ce test a d'ailleurs été utilisé afin d'étudier la sélectivité d'une petite molécule, AMD3100, dans l'inhibition de l'entrée du VIH-1 par le corécepteur CXCR4 (199). Notre étude de l'inhibition sélective de l'entrée du VIH-1 par le corécepteur CCR5 a débuté avec la validation de notre système expérimental. Nous avons utilisé des molécules déjà caractérisées par rapport à leur pouvoir antirétroviral et leur sélectivité. La petite molécule TAK779 a démontré une activité antivirale sélective pour CCR5 comparable à ce qui a été démontré par Baba et al. (190). Le composé peptidique TC14012, un antagoniste de CXCR4 (220), a quant à lui permis de démontrer que notre système expérimental était efficace pour déterminer la sélectivité d'un composé dans l'inhibition de l'entrée par ce corécepteur. Nous avons ensuite testé le pouvoir antiviral des molécules extraites du thé vert EGCG, TD et TM et des composés 446, 693, 699 et RK2.

Les dérivés du thé vert ont démontré un pouvoir antiviral non sélectif lors de l'infection des cellules cibles U373MG X4.15 et U373MG R5.3 par le VIH-1_{89.6}. EGCG, TD et TM inhibent la production de β -galactosidase dépendante de l'infection par le VIH-1, quel que soit le corécepteur présent à la surface cellulaire. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Fassina et al. (221). Ces derniers étudièrent l'infection de PBMC par les souches VIH-1_{LAI/III} (X4 tropique) et VIH-1_{Ba-L} (R5 tropique) en présence de EGCG (221). Ils détectèrent l'activité de la transcriptase inverse et dosèrent la p24 (capside) dans le surnageant 7 jours post-infection et conclurent que EGCG permettait d'inhiber la réplication virale, indépendamment du tropisme. Donc, en plus d'agir en tant qu'antagoniste de CCR5, ces molécules pourraient inhiber d'autres étapes du cycle de réplication virale. Une étude a d'ailleurs suggéré que EGCG pouvait bloquer l'entrée du

VIH-1 en liant CD4 (222). L'incubation de PBMC avec cette molécule permet à la fois d'inhiber la fixation d'un anticorps dirigé contre CD4 et l'interaction entre ce récepteur et VIH-1 SU. La transcriptase inverse serait également une cible potentielle de ces molécules, tel que démontré par des études de rétrotranscription *in vitro* (223).

Les molécules extraites du thé vert pourraient agir en tant qu'agents antiviraux bloquant la réplication des rétrovirus humains, que ce soit au niveau de l'entrée virale ou non. La consommation de thé vert a d'ailleurs été associée à une diminution, bien que faible, de la charge virale de patients infectés par HTLV-1 (224). Les patients de cette cohorte ont consommé 9 capsules contenant les extraits de thé vert en poudre par jour, pendant 5 mois (équivalant à 10 tasses de thé vert par jour). Cette consommation mène à une concentration de EGCG plasmatique de 0,3µg/mL, ce qui est 10 à 100 fois moins concentré que la dose nécessaire pour inhiber la prolifération des lymphocytes T infectés par HTLV-1 *in vitro* (224, 225). Ces extraits sont également impliqués en tant qu'agents préventifs antitumoraux. Par exemple, deux études épidémiologiques ont démontré que la consommation de thé vert pouvait réduire de 48 à 59% les risques de développer un cancer de l'estomac (226, 227). Les molécules extraites du thé vert sont donc à la fois très actives, sans être sélectives. Dans la majorité des cas, ce type de composés provoquent des effets secondaires indésirables. Les molécules présentent dans le thé vert quant à elles ne semblent pas induire de tels effets. Toutefois, la quantité qui doit être consommée pour atteindre une concentration plasmatique efficace est très élevée. Nos résultats montrent que 90% de l'infection par les particules virales VIH-1_{89.6} peut être bloquée par EGCG, TD et TM, à une concentration de 20µM ou 9,1µg/mL. Cette concentration est 30 fois plus importante que celle retrouvée au niveau de la circulation sanguine après la consommation quotidienne de 10 tasses de thé vert, estimée par Sonoda et al. (224). Elle est également équivalente aux valeurs obtenues lors de précédentes études d'inhibition de l'infection de HTLV-1 *in vitro*, tel que démontré ci-haut.

Cette interaction entre EGCG et CD4 pourrait également avoir un impact sur la fonction intrinsèque des lymphocytes T CD4⁺ lors de la réponse immunitaire. En effet, EGCG pourrait bloquer la liaison de CD4 au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, inhibant ainsi l'activation des lymphocytes T CD4⁺ suite à la présentation d'un antigène. Jusqu'à maintenant, les études s'intéressant aux extraits du thé vert n'ont porté que sur le pouvoir antiviral et sur la caractérisation moléculaire du domaine de liaison de EGCG à CD4. Il n'est donc pas encore connu si cette interaction affecte la fonction des lymphocytes T CD4⁺.

La molécule 446 inhibe l'expression de la β -galactosidase lors de l'infection des cellules U373MG X4.15 et U373MG R5.3 par le VIH-1_{89.6}. Elle pourrait ainsi lier à la fois CCR5 et CXCR4 ou agir sur d'autres étapes du cycle de réplication virale, le premier étant plus probable compte tenu du criblage initial. Le composé RK2 inhibe également l'infection des cellules cibles exprimant le corécepteur CCR5. La chute abrupte de la courbe d'inhibition de l'infection des cellules U373MG X4.15 semble toutefois démontrer que ce composé serait toxique. Il pourrait ainsi tuer les cellules cibles et inhiber la production de β -galactosidase. Il serait possible de tester la toxicité des molécules dans une expérience mesurant la viabilité cellulaire (tests MTT ou XTT). Quant à lui, le composé 699 démontre un pouvoir antiviral négligeable lors de l'inhibition de l'infection du VIH-1_{89.6}. Bien que les molécules 446, RK2 et 699 soient des antagonistes de CCR5 (201), leur comportement lors de l'inhibition de l'infection du VIH-1 est distinct. Le composé 446 permet de bloquer l'infection de cellules cibles par le VIH-1_{89.6} sans être sélectif pour l'un ou l'autre des récepteurs d'entrée. Le composé 699 ne démontre qu'un faible pouvoir antiviral. Le composé RK2 quant à lui serait toxique pour les cellules cibles. Pour toutes ces raisons, ces 3 molécules ont été écartées pour la suite de l'étude.

Le composé 693 est le seul qui répond parfaitement aux critères fixés pour notre étude. Il inhibe de façon dose-dépendante l'infection de cellules cibles par le

VIH-1_{89.6} en ciblant sélectivement le corécepteur CCR5, sans être toxique à haute concentration. Ce composé est très intéressant puisqu'il possède une haute sélectivité pour ce corécepteur, même si son pouvoir antiviral est faible comparativement aux autres inhibiteurs en cours de développement. Cette caractéristique de 693 est très encourageante pour le développement de dérivés. L'objectif final serait de synthétiser des dérivés qui arboreraient au moins le niveau de sélectivité de 693, tout en montrant un pouvoir antirétroviral de 1000 à 10 000 fois important.

La structure centrale de la molécule 693 est similaire à celle de Vicriviroc, un inhibiteur d'entrée du VIH-1 qui cible le corécepteur CCR5 (Schering-Plough) (194). Les études de phase clinique I ont démontré que Vicriviroc est sûre et bien tolérée lorsque utilisée en monothérapie chez des patients infectés (228). Il serait donc envisageable qu'un dérivé de la molécule 693, possédant un pouvoir antirétroviral équivalent à celui de Vicriviroc, puisse un jour se faire une place sur le marché des agents antirétroviraux.

Maraviroc, développée par Pfizer Inc (196), devrait être la première molécule ciblant le corécepteur CCR5 à être approuvée pour le traitement de patients infectés par le VIH-1. Les résultats préliminaires concernant les études de phase clinique II sont très encourageants. Il est toutefois nécessaire de développer d'autres molécules ciblant l'entrée par CCR5 pour faire face à l'émergence de souches résistantes. En effet, une étude récente de Baba et al. a identifié une souche d'isolat primaire R5 tropique VIH-1_{KK} résistante à TAK652, un inhibiteur d'entrée ciblant CCR5 (229). Il s'agit d'une étude longitudinale *in vitro* dans laquelle des PBMC ont été infectées par le VIH-1_{KK} (R5 tropique) et cultivées en présence d'une dose croissante de TAK652. La souche virale résistante, qui est apparue après 67 semaines de culture, est 200 000 fois plus résistante à cet agent antiviral que la souche sauvage. Ce délai est relativement long comparativement à ce qui a été démontré pour d'autres inhibiteurs. En effet, les études de phase clinique I où l'inhibiteur de fusion T20 était administré en monothérapie, ont montré l'apparition de souches résistantes à cet agent après seulement 14 jours de

traitement (230). Les essais clinique de phase II ont par la suite montré que le T20, utilisé en combinaison avec d'autres agents antirétroviraux, permettait de diminuer de façon significative la charge virale chez les patients infectés (231). L'apparition de souches résistantes à la molécule TAK652 ne devrait donc pas être un obstacle à la poursuite de l'étude de cette molécule. Tout comme pour le T20, cette molécule pourrait être utilisée en combinaison avec d'autres agents antirétroviraux.

5. CONCLUSION

Dans un premier temps, cette étude nous a permis d'approfondir le rôle joué par la neuropiline-1 (NRP1) dans l'entrée du rétrovirus humain HTLV-1. Nos résultats montrent que la présence de cette protéine à la surface d'une cellule cible favorise l'entrée des pseudotypes viraux HTLV-2 et, par extrapolation, de HTLV-1. Nous avons également caractérisé le domaine de NRP1 responsable de l'interaction avec la protéine SU de HTLV-1 en créant des mutants de NRP1 soluble portant des délétions pour les différents domaines. Nous avons ainsi démontré que les domaines extracellulaires sont tous suffisants pour la liaison de HTLV-1 SU. Les mutants possédant le domaine transmembranaire que nous avons produits sont présentement utilisés par nos collaborateurs dans des études d'infection. Il sera ainsi possible de mesurer l'effet de l'absence d'un domaine de NRP1 sur l'infection par HTLV-1. Ces mêmes collaborateurs tentent également de caractériser le domaine d'interaction entre NRP1 et HTLV-1 Env en utilisant les domaines recombinants solubles du récepteur dans des études de co-immunoprécipitation et d'inhibition de l'infection.

Les domaines solubles de NRP1 pourraient être utilisés comme agents antiviraux bloquant l'entrée de HTLV-1. Des études successives permettraient d'affiner considérablement le domaine de NRP1 responsable de l'interaction avec HTLV-1. Nous pourrions en arriver à développer un peptide de quelques acides aminés possédant une activité antivirale intéressante. La structure chimique de ce peptide pourrait servir de base pour la synthèse rationnelle de molécules thérapeutiques.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié le pouvoir antiviral de différents composés lors de l'entrée du VIH-1 dans une cellule cible. Ces molécules furent d'abord caractérisées comme antagonistes de CCR5 dans une campagne de criblage à débit (201). Nous avons utilisé les lignées cellulaires U373MG X4.15 et U373MG R5.3, et une souche virale dual tropique VIH-1_{89.6}

afin de tester ces molécules. Notre objectif était d'identifier une molécule qui permettait d'inhiber l'infection virale en ciblant sélectivement l'entrée par CCR5. Le composé 693 a répondu à ces critères. Nous pouvons donc conclure qu'une molécule intéressante dans une campagne de criblage à haut débit ne l'est pas nécessairement dans un contexte antiviral. Nous avons démontré qu'une combinaison de ces 2 types d'études permet de caractériser efficacement l'activité biochimique et antiviral d'un inhibiteur potentiel.

À long terme, il serait intéressant de développer des dérivés du composé 693 afin d'augmenter son pouvoir antiviral et sa sélectivité pour le corécepteur d'entrée du VIH-1 CCR5. De tels dérivés pourraient même éventuellement être testés dans des essais cliniques. La mise en marché prochaine de Maraviroc laisse entrevoir un avenir intéressant pour les inhibiteurs ciblant les corécepteurs d'entrée. Les dérivés du composé 693 permettraient de diversifier la famille de molécules ciblant CCR5. Il serait alors possible de faire face à l'apparition certaine de souches virales résistantes aux autres inhibiteurs d'entrée.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. D'Souza, V., and M.F. Summers. 2005. How retroviruses select their genomes. *Nature reviews* 3:643-655.
2. Popov, S., M. Rexach, G. Zybarth, N. Reiling, M.A. Lee, L. Ratner, C.M. Lane, M.S. Moore, G. Blobel, and M. Bukrinsky. 1998. Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Embo J* 17:909-917.
3. Murphy, E.L., J.P. Figueroa, W.N. Gibbs, M. Holding-Cobham, B. Cranston, K. Malley, A.J. Bodner, S.S. Alexander, and W.A. Blattner. 1991. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. *Am J Epidemiol* 133:1114-1124.
4. Blattner, W.A., C. Saxinger, D. Riedel, B. Hull, G. Taylor, F. Cleghorn, R. Gallo, B. Blumberg, and C. Bartholomew. 1990. A study of HTLV-I and its associated risk factors in Trinidad and Tobago. *J Acquir Immune Defic Syndr* 3:1102-1108.
5. Edlich, R.F., J.A. Arnette, and F.M. Williams. 2000. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *J Emerg Med* 18:109-119.
6. Hinuma, Y., H. Komoda, T. Chosa, T. Kondo, M. Kohakura, T. Takenaka, M. Kikuchi, M. Ichimaru, K. Yunoki, I. Sato, R. Matsuo, Y. Takiuchi, H. Uchino, and M. Hanaoka. 1982. Antibodies to adult T-cell leukemia-virus-associated antigen (ATLA) in sera from patients with ATL and controls in Japan: a nation-wide sero-epidemiologic study. *Int J Cancer* 29:631-635.
7. Mueller, N., A. Okayama, S. Stuver, and N. Tachibana. 1996. Findings from the Miyazaki Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13 Suppl 1:S2-7.
8. Power, C., B.G. Weinshenker, G.A. Dekaban, G.C. Ebers, G.S. Francis, and G.P. Rice. 1989. HTLV-1 associated myelopathy in Canada. *Can J Neurol Sci* 16:330-335.
9. Chiavetta, J.A., M. Escobar, A. Newman, Y. He, P. Driezen, S. Deeks, D.E. Hone, S.F. O'Brien, and G. Sher. 2003. Incidence and estimated rates of residual risk for HIV, hepatitis C, hepatitis B and human T-cell lymphotropic viruses in blood donors in Canada, 1990-2000. *Cmaj* 169:767-773.
10. Oger, J.J., D.H. Werker, D.J. Foti, and G.A. Dekaban. 1993. HTLV-I associated myelopathy: an endemic disease of Canadian aboriginals of the Northwest Pacific coast? *Can J Neurol Sci* 20:302-306.
11. Sibbald, B. 2006. HTLV-1 virus detected in Nunavut. *Cmaj* 174:150-151.

12. Matsuoka, M. 2003. Human T-cell leukemia virus type I and adult T-cell leukemia. *Oncogene* 22:5131-5140.
13. Osame, M., R. Janssen, H. Kubota, H. Nishitani, A. Igata, S. Nagataki, M. Mori, I. Goto, H. Shimabukuro, R. Khabbaz, and et al. 1990. Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. *Ann Neurol* 28:50-56.
14. Kannagi, M., T. Ohashi, S. Hanabuchi, H. Kato, Y. Koya, A. Hasegawa, T. Masuda, and T. Yoshiki. 2000. Immunological aspects of rat models of HTLV type 1-infected T lymphoproliferative disease. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:1737-1740.
15. Uchiyama, T., J. Yodoi, K. Sagawa, K. Takatsuki, and H. Uchino. 1977. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 50:481-492.
16. Osame, M., K. Usuku, S. Izumo, N. Ijichi, H. Amitani, A. Igata, M. Matsumoto, and M. Tara. 1986. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1:1031-1032.
17. Gessain, A., F. Barin, J.C. Vernant, O. Gout, L. Maurs, A. Calender, and G. de The. 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2:407-410.
18. Azimi, N., K. Brown, R.N. Bamford, Y. Tagaya, U. Siebenlist, and T.A. Waldmann. 1998. Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2452-2457.
19. Ballard, D.W., E. Bohnlein, J.W. Lowenthal, Y. Wano, B.R. Franza, and W.C. Greene. 1988. HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the kappa B element in the IL-2 receptor alpha gene. *Science* 241:1652-1655.
20. Crenon, I., C. Beraud, P. Simard, J. Montagne, P. Veschambre, and P. Jalinot. 1993. The transcriptionally active factors mediating the effect of the HTLV-I Tax transactivator on the IL-2R alpha kappa B enhancer include the product of the c-rel proto-oncogene. *Oncogene* 8:867-875.
21. Franchini, G. 1995. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood* 86:3619-3639.
22. Good, L., S.B. Maggirwar, and S.C. Sun. 1996. Activation of the IL-2 gene promoter by HTLV-I tax involves induction of NF-AT complexes bound to the CD28-responsive element. *Embo J* 15:3744-3750.

23. Mariner, J.M., V. Lantz, T.A. Waldmann, and N. Azimi. 2001. Human T cell lymphotropic virus type I Tax activates IL-15R alpha gene expression through an NF-kappa B site. *J Immunol* 166:2602-2609.
24. Uchiyama, T. 1997. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. *Annu Rev Immunol* 15:15-37.
25. Hollsberg, P., and D.A. Hafler. 1993. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type I infection. *N Engl J Med* 328:1173-1182.
26. Nakagawa, M., S. Izumo, S. Ijichi, H. Kubota, K. Arimura, M. Kawabata, and M. Osame. 1995. HTLV-I-associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *J Neurovirol* 1:50-61.
27. Osame, M., S. Izumo, A. Igata, M. Matsumoto, T. Matsumoto, S. Sonoda, M. Tara, and Y. Shibata. 1986. Blood transfusion and HTLV-I associated myelopathy. *Lancet* 2:104-105.
28. Khan, R.B., T.E. Bertorini, and M.C. Levin. 2001. HTLV-1 and its neurological complications. *Neurologist* 7:271-278.
29. Cavrois, M., A. Gessain, O. Gout, S. Wain-Hobson, and E. Wattel. 2000. Common human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) integration sites in cerebrospinal fluid and blood lymphocytes of patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis indicate that HTLV-1 crosses the blood-brain barrier via clonal HTLV-1-infected cells. *J Infect Dis* 182:1044-1050.
30. Lehky, T.J., C.H. Fox, S. Koenig, M.C. Levin, N. Flerlage, S. Izumo, E. Sato, C.S. Raine, M. Osame, and S. Jacobson. 1995. Detection of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax RNA in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by in situ hybridization. *Ann Neurol* 37:167-175.
31. Levin, M.C., M. Krichavsky, J. Berk, S. Foley, M. Rosenfeld, J. Dalmau, G. Chang, J.B. Posner, and S. Jacobson. 1998. Neuronal molecular mimicry in immune-mediated neurologic disease. *Ann Neurol* 44:87-98.
32. Mora, C.A., R.M. Garruto, P. Brown, D. Guiryo, O.S. Morgan, P. Rodgers-Johnson, M. Ceroni, R. Yanagihara, L.G. Goldfarb, C.J. Gibbs, Jr., and et al. 1988. Seroprevalence of antibodies to HTLV-I in patients with chronic neurological disorders other than tropical spastic paraparesis. *Ann Neurol* 23 Suppl:S192-195.
33. Morgan, O.S., P. Rodgers-Johnson, C. Mora, and G. Char. 1989. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet* 2:1184-1187.

34. Mochizuki, M., T. Watanabe, K. Yamaguchi, K. Tajima, K. Yoshimura, S. Nakashima, M. Shirao, S. Araki, N. Miyata, S. Mori, and et al. 1992. Uveitis associated with human T lymphotropic virus type I: seroepidemiologic, clinical, and virologic studies. *J Infect Dis* 166:943-944.
35. Mochizuki, M., T. Watanabe, K. Yamaguchi, K. Takatsuki, K. Yoshimura, M. Shirao, S. Nakashima, S. Mori, S. Araki, and N. Miyata. 1992. HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. *Jpn J Cancer Res* 83:236-239.
36. UNAIDS: The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. In.
37. Ho, D.D., A.U. Neumann, A.S. Perelson, W. Chen, J.M. Leonard, and M. Markowitz. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373:123-126.
38. Lanzrein, M., A. Schlegel, and C. Kempf. 1994. Entry and uncoating of enveloped viruses. *Biochem J* 302 (Pt 2):313-320.
39. Overbaugh, J., A.D. Miller, and M.V. Eiden. 2001. Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:371-389, table of contents.
40. Geijtenbeek, T.B., D.S. Kwon, R. Torensma, S.J. van Vliet, G.C. van Duijnhoven, J. Middel, I.L. Cornelissen, H.S. Nottet, V.N. KewalRamani, D.R. Littman, C.G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100:587-597.
41. Geijtenbeek, T.B., R. Torensma, S.J. van Vliet, G.C. van Duijnhoven, G.J. Adema, Y. van Kooyk, and C.G. Figdor. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575-585.
42. Pohlmann, S., F. Baribaud, B. Lee, G.J. Leslie, M.D. Sanchez, K. Hiebenthal-Millow, J. Munch, F. Kirchhoff, and R.W. Doms. 2001. DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* 75:4664-4672.
43. Hong, P.W., K.B. Flummerfelt, A. de Parseval, K. Gurney, J.H. Elder, and B. Lee. 2002. Human immunodeficiency virus envelope (gp120) binding to DC-SIGN and primary dendritic cells is carbohydrate dependent but does not involve 2G12 or cyanovirin binding sites: implications for structural analyses of gp120-DC-SIGN binding. *J Virol* 76:12855-12865.

44. Lue, J., M. Hsu, D. Yang, P. Marx, Z. Chen, and C. Cheng-Mayer. 2002. Addition of a single gp120 glycan confers increased binding to dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin and neutralization escape to human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 76:10299-10306.
45. Pohlmann, S., F. Baribaud, and R.W. Doms. 2001. DC-SIGN and DC-SIGNR: helping hands for HIV. *Trends in immunology* 22:643-646.
46. Kim, C.W., O.A. Goldberger, R.L. Gallo, and M. Bernfield. 1994. Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol Biol Cell* 5:797-805.
47. Iozzo, R.V. 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67:609-652.
48. Bernfield, M., M. Gotte, P.W. Park, O. Reizes, M.L. Fitzgerald, J. Lincecum, and M. Zako. 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 68:729-777.
49. Rapraeger, A.C., A. Krufka, and B.B. Olwin. 1991. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252:1705-1708.
50. Yayon, A., M. Klagsbrun, J.D. Esko, P. Leder, and D.M. Ornitz. 1991. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64:841-848.
51. Lyon, M., G. Rushton, and J.T. Gallagher. 1997. The interaction of the transforming growth factor-betas with heparin/heparan sulfate is isoform-specific. *J Biol Chem* 272:18000-18006.
52. Ji, Z.S., D.A. Sanan, and R.W. Mahley. 1995. Intravenous heparinase inhibits remnant lipoprotein clearance from the plasma and uptake by the liver: in vivo role of heparan sulfate proteoglycans. *J Lipid Res* 36:583-592.
53. Spillmann, D. 2001. Heparan sulfate: anchor for viral intruders? *Biochimie* 83:811-817.
54. Pinon, J.D., P.J. Klasse, S.R. Jassal, S. Welson, J. Weber, D.W. Brighty, and Q.J. Sattentau. 2003. Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Virol* 77:9922-9930.
55. Okuma, K., K.P. Dalton, L. Buonocore, E. Ramsburg, and J.K. Rose. 2003. Development of a novel surrogate virus for human T-cell leukemia virus type 1: inhibition of infection by osteoprotegerin. *J Virol* 77:8562-8569.

56. Jones, K.S., C. Petrow-Sadowski, D.C. Bertolette, Y. Huang, and F.W. Ruscetti. 2005. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4⁺ T cells. *J Virol* 79:12692-12702.
57. Patel, M., M. Yanagishita, G. Roderiquez, D.C. Bou-Habib, T. Oravec, V.C. Hascall, and M.A. Norcross. 1993. Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9:167-174.
58. Albritton, L.M., L. Tseng, D. Scadden, and J.M. Cunningham. 1989. A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* 57:659-666.
59. Kavanaugh, M.P., D.G. Miller, W. Zhang, W. Law, S.L. Kozak, D. Kabat, and A.D. Miller. 1994. Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7071-7075.
60. Miller, D.G., R.H. Edwards, and A.D. Miller. 1994. Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:78-82.
61. Richardson, J., G. Pancino, R. Merat, T. Leste-Lasserre, A. Moraillon, J. Schneider-Mergener, M. Alizon, P. Sonigo, and N. Heveker. 1999. Shared usage of the chemokine receptor CXCR4 by primary and laboratory-adapted strains of feline immunodeficiency virus. *J Virol* 73:3661-3671.
62. Shimojima, M., T. Miyazawa, Y. Ikeda, E.L. McMonagle, H. Haining, H. Akashi, Y. Takeuchi, M.J. Hosie, and B.J. Willett. 2004. Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. *Science* 303:1192-1195.
63. Willett, B.J., E.L. McMonagle, S. Ridha, and M.J. Hosie. 2006. Differential utilization of CD134 as a functional receptor by diverse strains of feline immunodeficiency virus. *J Virol* 80:3386-3394.
64. Shaheen, F., and R.G. Collman. 2004. Co-receptor antagonists as HIV-1 entry inhibitors. *Current opinion in infectious diseases* 17:7-16.
65. Johnson, D.C., and M.T. Huber. 2002. Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *J Virol* 76:1-8.
66. Bangham, C.R. 2003. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *J Gen Virol* 84:3177-3189.

67. Derse, D., S.A. Hill, P.A. Lloyd, H. Chung, and B.A. Morse. 2001. Examining human T-lymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. *J Virol* 75:8461-8468.
68. Fan, N., J. Gavalchin, B. Paul, K.H. Wells, M.J. Lane, and B.J. Poiesz. 1992. Infection of peripheral blood mononuclear cells and cell lines by cell-free human T-cell lymphoma/leukemia virus type I. *Journal of clinical microbiology* 30:905-910.
69. Alfsen, A., H. Yu, A. Magerus-Chatinet, A. Schmitt, and M. Bomsel. 2005. HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer. *Mol Biol Cell* 16:4267-4279.
70. Jolly, C., and Q.J. Sattentau. 2004. Retroviral spread by induction of virological synapses. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 5:643-650.
71. Daenke, S., S.A. McCracken, and S. Booth. 1999. Human T-cell leukaemia/lymphoma virus type 1 syncytium formation is regulated in a cell-specific manner by ICAM-1, ICAM-3 and VCAM-1 and can be inhibited by antibodies to integrin beta2 or beta7. *J Gen Virol* 80 (Pt 6):1429-1436.
72. Hildreth, J.E., A. Subramaniam, and R.A. Hampton. 1997. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation mediated by vascular cell adhesion molecule-1: evidence for involvement of cell adhesion molecules in HTLV-1 biology. *J Virol* 71:1173-1180.
73. Igakura, T., J.C. Stinchcombe, P.K. Goon, G.P. Taylor, J.N. Weber, G.M. Griffiths, Y. Tanaka, M. Osame, and C.R. Bangham. 2003. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 299:1713-1716.
74. Piguet, V., and Q. Sattentau. 2004. Dangerous liaisons at the virological synapse. *The Journal of clinical investigation* 114:605-610.
75. Poiesz, B.J., F.W. Ruscetti, A.F. Gazdar, P.A. Bunn, J.D. Minna, and R.C. Gallo. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:7415-7419.
76. Seiki, M., S. Hattori, Y. Hirayama, and M. Yoshida. 1983. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:3618-3622.
77. Le Blanc, I., M.P. Grange, L. Delamarre, A.R. Rosenberg, V. Blot, C. Pique, and M.C. Dokhelar. 2001. HTLV-1 structural proteins. *Virus Res* 78:5-16.

78. Paine, E., R. Gu, and L. Ratner. 1994. Structure and expression of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope protein. *Virology* 199:331-338.
79. Pique, C., D. Pham, T. Tursz, and M.C. Dokhelar. 1992. Human T-cell leukemia virus type I envelope protein maturation process: requirements for syncytium formation. *J Virol* 66:906-913.
80. Delamarre, L., C. Pique, D. Pham, T. Tursz, and M.C. Dokhelar. 1994. Identification of functional regions in the human T-cell leukemia virus type I SU glycoprotein. *J Virol* 68:3544-3549.
81. Delamarre, L., A.R. Rosenberg, C. Pique, D. Pham, and M.C. Dokhelar. 1997. A novel human T-leukemia virus type 1 cell-to-cell transmission assay permits definition of SU glycoprotein amino acids important for infectivity. *J Virol* 71:259-266.
82. Pique, C., T. Tursz, and M.C. Dokhelar. 1990. Mutations introduced along the HTLV-I envelope gene result in a non-functional protein: a basis for envelope conservation? *Embo J* 9:4243-4248.
83. Rosenberg, A.R., L. Delamarre, A. Preira, and M.C. Dokhelar. 1998. Analysis of functional conservation in the surface and transmembrane glycoprotein subunits of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *J Virol* 72:7609-7614.
84. Tsukahara, T., M.M. Wielgosz, and L. Ratner. 2001. Characterization of envelope glycoprotein mutants for human T-cell leukemia virus type 1 infectivity and immortalization. *J Virol* 75:9553-9559.
85. Manel, N., F.J. Kim, S. Kinet, N. Taylor, M. Sitbon, and J.L. Battini. 2003. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* 115:449-459.
86. Hanon, E., J.C. Stinchcombe, M. Saito, B.E. Asquith, G.P. Taylor, Y. Tanaka, J.N. Weber, G.M. Griffiths, and C.R. Bangham. 2000. Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. *Immunity* 13:657-664.
87. Hoxie, J.A., D.M. Matthews, and D.B. Cines. 1984. Infection of human endothelial cells by human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:7591-7595.
88. Macatonia, S.E., J.K. Cruickshank, P. Rudge, and S.C. Knight. 1992. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8:1699-1706.

89. Okuma, K., M. Nakamura, S. Nakano, Y. Niho, and Y. Matsuura. 1999. Host range of human T-cell leukemia virus type I analyzed by a cell fusion-dependent reporter gene activation assay. *Virology* 254:235-244.
90. Sutton, R.E., and D.R. Littman. 1996. Broad host range of human T-cell leukemia virus type 1 demonstrated with an improved pseudotyping system. *J Virol* 70:7322-7326.
91. Manel, N., S. Kinet, J.L. Battini, F.J. Kim, N. Taylor, and M. Sitbon. 2003. The HTLV receptor is an early T-cell activation marker whose expression requires de novo protein synthesis. *Blood* 101:1913-1918.
92. Nath, M.D., F.W. Ruscetti, C. Petrow-Sadowski, and K.S. Jones. 2003. Regulation of the cell-surface expression of an HTLV-I binding protein in human T cells during immune activation. *Blood* 101:3085-3092.
93. Richardson, J.H., A.J. Edwards, J.K. Cruickshank, P. Rudge, and A.G. Dalgleish. 1990. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol* 64:5682-5687.
94. Girerd, Y., H. Casse, M. Duc Dodon, and L. Gazzolo. 1995. Human T cell leukaemia virus type I env gene-transfected HeLa cells display a decrease in cell fusion ability. *J Gen Virol* 76 (Pt 4):1021-1024.
95. Pique, C., F. Saal, J. Peries, D. Pham, T. Tursz, and M.C. Dokhelar. 1994. Functional comparison between HTLV-I envelopes originating from TSP/HAM or ATL cell lines. *J Acquir Immune Defic Syndr* 7:319-324.
96. Donegan, E., H. Lee, E.A. Operskalski, G.M. Shaw, S.H. Kleinman, M.P. Busch, C.E. Stevens, E.R. Schiff, M.J. Nowicki, C.G. Hollingsworth, and et al. 1994. Transfusion transmission of retroviruses: human T-lymphotropic virus types I and II compared with human immunodeficiency virus type 1. *Transfusion* 34:478-483.
97. Sommerfelt, M.A., B.P. Williams, P.R. Clapham, E. Solomon, P.N. Goodfellow, and R.A. Weiss. 1988. Human T cell leukemia viruses use a receptor determined by human chromosome 17. *Science* 242:1557-1559.
98. Kim, F.J., I. Seiliez, C. Denesvre, D. Lavillette, F.L. Cosset, and M. Sitbon. 2000. Definition of an amino-terminal domain of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope surface unit that extends the fusogenic range of an ecotropic murine leukemia virus. *J Biol Chem* 275:23417-23420.
99. Jin, Q., L. Agrawal, Z. VanHorn-Ali, and G. Alkhatib. 2006. Infection of CD4+ T lymphocytes by the human T cell leukemia virus type 1 is mediated by the glucose transporter GLUT-1: evidence using antibodies specific to the receptor's large extracellular domain. *Virology* 349:184-196.

100. Ghez, D., Y. Lepelletier, S. Lambert, J.M. Fourneau, V. Blot, S. Janvier, B. Arnulf, P.M. van Endert, N. Heveker, C. Pique, and O. Hermine. 2006. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol* 80:6844-6854.
101. Takagi, S., T. Hirata, K. Agata, M. Mochii, G. Eguchi, and H. Fujisawa. 1991. The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron* 7:295-307.
102. Takagi, S., T. Tsuji, T. Amagai, T. Takamatsu, and H. Fujisawa. 1987. Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies. *Dev Biol* 122:90-100.
103. Takagi, S., Y. Kasuya, M. Shimizu, T. Matsuura, M. Tsuboi, A. Kawakami, and H. Fujisawa. 1995. Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. *Dev Biol* 170:207-222.
104. Kawakami, A., T. Kitsukawa, S. Takagi, and H. Fujisawa. 1996. Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *J Neurobiol* 29:1-17.
105. Fujisawa, H., T. Kitsukawa, A. Kawakami, S. Takagi, M. Shimizu, and T. Hirata. 1997. Roles of a neuronal cell-surface molecule, neuropilin, in nerve fiber fasciculation and guidance. *Cell Tissue Res* 290:465-470.
106. Kolodkin, A.L., D.V. Levensgood, E.G. Rowe, Y.T. Tai, R.J. Giger, and D.D. Ginty. 1997. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90:753-762.
107. He, Z., and M. Tessier-Lavigne. 1997. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90:739-751.
108. Soker, S., S. Takashima, H.Q. Miao, G. Neufeld, and M. Klagsbrun. 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92:735-745.
109. Migdal, M., B. Huppertz, S. Tessler, A. Comforti, M. Shibuya, R. Reich, H. Baumann, and G. Neufeld. 1998. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem* 273:22272-22278.
110. Giger, R.J., E.R. Urquhart, S.K. Gillespie, D.V. Levensgood, D.D. Ginty, and A.L. Kolodkin. 1998. Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* 21:1079-1092.
111. Kitsukawa, T., M. Shimizu, M. Sanbo, T. Hirata, M. Taniguchi, Y. Bekku, T. Yagi, and H. Fujisawa. 1997. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated

chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19:995-1005.

112. Gu, C., B.J. Limberg, G.B. Whitaker, B. Perman, D.J. Leahy, J.S. Rosenbaum, D.D. Ginty, and A.L. Kolodkin. 2002. Characterization of neuropilin-1 structural features that confer binding to semaphorin 3A and vascular endothelial growth factor 165. *J Biol Chem* 277:18069-18076.
113. Nakamura, F., M. Tanaka, T. Takahashi, R.G. Kalb, and S.M. Strittmatter. 1998. Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron* 21:1093-1100.
114. Takahashi, T., A. Fournier, F. Nakamura, L.H. Wang, Y. Murakami, R.G. Kalb, H. Fujisawa, and S.M. Strittmatter. 1999. Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99:59-69.
115. Tordjman, R., Y. Lepelletier, V. Lemarchandel, M. Cambot, P. Gaulard, O. Hermine, and P.H. Romeo. 2002. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol* 3:477-482.
116. Miao, H.Q., P. Lee, H. Lin, S. Soker, and M. Klagsbrun. 2000. Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *Faseb J* 14:2532-2539.
117. Huang, C.C., M. Tang, M.Y. Zhang, S. Majeed, E. Montabana, R.L. Stanfield, D.S. Dimitrov, B. Korber, J. Sodroski, I.A. Wilson, R. Wyatt, and P.D. Kwong. 2005. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* 310:1025-1028.
118. Klatzmann, D., F. Barre-Sinoussi, M.T. Nugeyre, C. Danquet, E. Vilmer, C. Griscelli, F. Brun-Veziret, C. Rouzioux, J.C. Gluckman, J.C. Chermann, and et al. 1984. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science* 225:59-63.
119. Dalgleish, A.G., P.C. Beverley, P.R. Clapham, D.H. Crawford, M.F. Greaves, and R.A. Weiss. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763-767.
120. Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J.C. Gluckman, and L. Montagnier. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312:767-768.
121. McDougal, J.S., M.S. Kennedy, J.M. Sligh, S.P. Cort, A. Mawle, and J.K. Nicholson. 1986. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* 231:382-385.

122. Maddon, P.J., A.G. Dalgleish, J.S. McDougal, P.R. Clapham, R.A. Weiss, and R. Axel. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47:333-348.
123. Maddon, P.J., D.R. Littman, M. Godfrey, D.E. Maddon, L. Chess, and R. Axel. 1985. The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell* 42:93-104.
124. Bour, S., R. Geleziunas, and M.A. Wainberg. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol Rev* 59:63-93.
125. Richardson, N.E., N.R. Brown, R.E. Hussey, A. Vaid, T.J. Matthews, D.P. Bolognesi, and E.L. Reinherz. 1988. Binding site for human immunodeficiency virus coat protein gp120 is located in the NH2-terminal region of T4 (CD4) and requires the intact variable-region-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6102-6106.
126. Ryu, S.E., P.D. Kwong, A. Truneh, T.G. Porter, J. Arthos, M. Rosenberg, X.P. Dai, N.H. Xuong, R. Axel, R.W. Sweet, and et al. 1990. Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4. *Nature* 348:419-426.
127. Wang, J.H., Y.W. Yan, T.P. Garrett, J.H. Liu, D.W. Rodgers, R.L. Garlick, G.E. Tarr, Y. Husain, E.L. Reinherz, and S.C. Harrison. 1990. Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature* 348:411-418.
128. Choe, H.R., and J. Sodroski. 1992. Contribution of charged amino acids in the CDR2 region of CD4 to HIV-1 gp120 binding. *J Acquir Immune Defic Syndr* 5:204-210.
129. Moebius, U., L.K. Clayton, S. Abraham, S.C. Harrison, and E.L. Reinherz. 1992. The human immunodeficiency virus gp120 binding site on CD4: delineation by quantitative equilibrium and kinetic binding studies of mutants in conjunction with a high-resolution CD4 atomic structure. *J Exp Med* 176:507-517.
130. Tsui, P., R.W. Sweet, G. Sathe, and M. Rosenberg. 1992. An efficient phage plaque screen for the random mutational analysis of the interaction of HIV-1 gp120 with human CD4. *J Biol Chem* 267:9361-9367.
131. Ryu, S.E., A. Truneh, R.W. Sweet, and W.A. Hendrickson. 1994. Structures of an HIV and MHC binding fragment from human CD4 as refined in two crystal lattices. *Structure* 2:59-74.

132. Feng, Y., C.C. Broder, P.E. Kennedy, and E.A. Berger. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272:872-877.
133. Bleul, C.C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, and T.A. Springer. 1996. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382:829-833.
134. Ueda, H., M.A. Siani, W. Gong, D.A. Thompson, G.G. Brown, and J.M. Wang. 1997. Chemically synthesized SDF-1 α analogue, N33A, is a potent chemotactic agent for CXCR4/Fusin/LESTR-expressing human leukocytes. *J Biol Chem* 272:24966-24970.
135. Deichmann, M., R. Kronenwett, and R. Haas. 1997. Expression of the human immunodeficiency virus type-1 coreceptors CXCR-4 (fusin, LESTR) and CKR-5 in CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 89:3522-3528.
136. Granelli-Piperno, A., B. Moser, M. Pope, D. Chen, Y. Wei, F. Isdell, U. O'Doherty, W. Paxton, R. Koup, S. Mojsov, N. Bhardwaj, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and R.M. Steinman. 1996. Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *J Exp Med* 184:2433-2438.
137. Murphy, P.M., M. Baggiolini, I.F. Charo, C.A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L.H. Miller, J.J. Oppenheim, and C.A. Power. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52:145-176.
138. Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M.E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S.N. Wagner, J.L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui, and A. Zlotnik. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-56.
139. Cocchi, F., A.L. DeVico, A. Garzino-Demo, S.K. Arya, R.C. Gallo, and P. Lusso. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. *Science* 270:1811-1815.
140. Combadiere, C., S.K. Ahuja, H.L. Tiffany, and P.M. Murphy. 1996. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(α), MIP-1(β), and RANTES. *J Leukoc Biol* 60:147-152.
141. Raport, C.J., J. Gosling, V.L. Schweickart, P.W. Gray, and I.F. Charo. 1996. Molecular cloning and functional characterization of a novel human

- CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J Biol Chem* 271:17161-17166.
142. Samson, M., O. Labbe, C. Mollereau, G. Vassart, and M. Parmentier. 1996. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 35:3362-3367.
 143. Alkhatib, G., C. Combadiere, C.C. Broder, Y. Feng, P.E. Kennedy, P.M. Murphy, and E.A. Berger. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272:1955-1958.
 144. Dragic, T., V. Litwin, G.P. Allaway, S.R. Martin, Y. Huang, K.A. Nagashima, C. Cayanan, P.J. Maddon, R.A. Koup, J.P. Moore, and W.A. Paxton. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381:667-673.
 145. Doranz, B.J., J. Rucker, Y. Yi, R.J. Smyth, M. Samson, S.C. Peiper, M. Parmentier, R.G. Collman, and R.W. Doms. 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85:1149-1158.
 146. Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P.D. Ponath, L. Wu, C.R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski. 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85:1135-1148.
 147. Rubbert, A., C. Combadiere, M. Ostrowski, J. Arthos, M. Dybul, E. Machado, M.A. Cohn, J.A. Hoxie, P.M. Murphy, A.S. Fauci, and D. Weissman. 1998. Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry. *J Immunol* 160:3933-3941.
 148. Ruiz, M.E., C. Cicala, J. Arthos, A. Kinter, A.T. Catanzaro, J. Adelsberger, K.L. Holmes, O.J. Cohen, and A.S. Fauci. 1998. Peripheral blood-derived CD34+ progenitor cells: CXC chemokine receptor 4 and CC chemokine receptor 5 expression and infection by HIV. *J Immunol* 161:4169-4176.
 149. Bleul, C.C., L. Wu, J.A. Hoxie, T.A. Springer, and C.R. Mackay. 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1925-1930.
 150. Loetscher, P., M. Uguccioni, L. Bordoli, M. Baggiolini, B. Moser, C. Chizzolini, and J.M. Dayer. 1998. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391:344-345.
 151. Zaitseva, M., A. Blauvelt, S. Lee, C.K. Lapham, V. Klaus-Kovtun, H. Mostowski, J. Manischewitz, and H. Golding. 1997. Expression and

- function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* 3:1369-1375.
152. Zaitseva, M.B., S. Lee, R.L. Rabin, H.L. Tiffany, J.M. Farber, K.W. Peden, P.M. Murphy, and H. Golding. 1998. CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection. *J Immunol* 161:3103-3113.
 153. Blanpain, C., I. Migeotte, B. Lee, J. Vakili, B.J. Doranz, C. Govaerts, G. Vassart, R.W. Doms, and M. Parmentier. 1999. CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood* 94:1899-1905.
 154. Lederman, M.M., A. Penn-Nicholson, M. Cho, and D. Mosier. 2006. Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment. *Jama* 296:815-826.
 155. Oppermann, M. 2004. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cellular signalling* 16:1201-1210.
 156. Aramori, I., S.S. Ferguson, P.D. Bieniasz, J. Zhang, B. Cullen, and M.G. Cullen. 1997. Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an HIV-1 co-receptor. *Embo J* 16:4606-4616.
 157. Zhao, J., L. Ma, Y.L. Wu, P. Wang, W. Hu, and G. Pei. 1998. Chemokine receptor CCR5 functionally couples to inhibitory G proteins and undergoes desensitization. *Journal of cellular biochemistry* 71:36-45.
 158. Luster, A.D. 2002. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 14:129-135.
 159. Luther, S.A., and J.G. Cyster. 2001. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2:102-107.
 160. Nieto, M., F. Navarro, J.J. Perez-Villar, M.A. del Pozo, R. Gonzalez-Amaro, M. Mellado, J.M. Frade, A.C. Martinez, M. Lopez-Botet, and F. Sanchez-Madrid. 1998. Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions. *J Immunol* 161:3330-3339.
 161. Liu, R., W.A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S.R. Martin, R. Horuk, M.E. MacDonald, H. Stuhlmann, R.A. Koup, and N.R. Landau. 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86:367-377.
 162. Janvier, S., and N. Heveker. 2005. [Mystery upon the origin for the selection of AIDS-protective CCR5Delta32]. *Med Sci (Paris)* 21:577-579.

163. Samson, M., F. Libert, B.J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C.M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R.J. Smyth, R.G. Collman, R.W. Doms, G. Vassart, and M. Parmentier. 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382:722-725.
164. Balotta, C., P. Bagnarelli, M. Violin, A.L. Ridolfo, D. Zhou, A. Berlusconi, S. Corvasce, M. Corbellino, M. Clementi, M. Clerici, M. Moroni, and M. Galli. 1997. Homozygous delta 32 deletion of the CCR-5 chemokine receptor gene in an HIV-1-infected patient. *Aids* 11:F67-71.
165. Biti, R., R. Ffrench, J. Young, B. Bennetts, G. Stewart, and T. Liang. 1997. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med* 3:252-253.
166. O'Brien, T.R., C. Winkler, M. Dean, J.A. Nelson, M. Carrington, N.L. Michael, and G.C. White, 2nd. 1997. HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 delta 32. *Lancet* 349:1219.
167. Theodorou, I., L. Meyer, M. Magierowska, C. Katlama, and C. Rouzioux. 1997. HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5 delta 32. Seroco Study Group. *Lancet* 349:1219-1220.
168. Dean, M., M. Carrington, C. Winkler, G.A. Huttley, M.W. Smith, R. Allikmets, J.J. Goedert, S.P. Buchbinder, E. Vittinghoff, E. Gomperts, S. Donfield, D. Vlahov, R. Kaslow, A. Saah, C. Rinaldo, R. Detels, and S.J. O'Brien. 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273:1856-1862.
169. Eugen-Olsen, J., A.K. Iversen, P. Garred, U. Koppelhus, C. Pedersen, T.L. Benfield, A.M. Sorensen, T. Katzenstein, E. Dickmeiss, J. Gerstoft, P. Skinhoj, A. Svejgaard, J.O. Nielsen, and B. Hofmann. 1997. Heterozygosity for a deletion in the CKR-5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *Aids* 11:305-310.
170. Huang, Y., W.A. Paxton, S.M. Wolinsky, A.U. Neumann, L. Zhang, T. He, S. Kang, D. Ceradini, Z. Jin, K. Yazdanbakhsh, K. Kunstman, D. Erickson, E. Dragon, N.R. Landau, J. Phair, D.D. Ho, and R.A. Koup. 1996. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 2:1240-1243.

171. Rappaport, J., Y.Y. Cho, H. Hendel, E.J. Schwartz, F. Schachter, and J.F. Zagury. 1997. 32 bp CCR-5 gene deletion and resistance to fast progression in HIV-1 infected heterozygotes. *Lancet* 349:922-923.
172. Tersmette, M., R.A. Gruters, F. de Wolf, R.E. de Goede, J.M. Lange, P.T. Schellekens, J. Goudsmit, H.G. Huisman, and F. Miedema. 1989. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J Virol* 63:2118-2125.
173. Berger, E.A., R.W. Doms, E.M. Fenyo, B.T. Korber, D.R. Littman, J.P. Moore, Q.J. Sattentau, H. Schuitemaker, J. Sodroski, and R.A. Weiss. 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* 391:240.
174. Connor, R.I., K.E. Sheridan, D. Ceradini, S. Choe, and N.R. Landau. 1997. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med* 185:621-628.
175. Scarlatti, G., E. Tresoldi, A. Bjorndal, R. Fredriksson, C. Colognesi, H.K. Deng, M.S. Malnati, A. Plebani, A.G. Siccardi, D.R. Littman, E.M. Fenyo, and P. Lusso. 1997. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* 3:1259-1265.
176. Penn, M.L., J.C. Grivel, B. Schramm, M.A. Goldsmith, and L. Margolis. 1999. CXCR4 utilization is sufficient to trigger CD4+ T cell depletion in HIV-1-infected human lymphoid tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:663-668.
177. de Roda Husman, A.M., R.P. van Rij, H. Blaak, S. Broersen, and H. Schuitemaker. 1999. Adaptation to promiscuous usage of chemokine receptors is not a prerequisite for human immunodeficiency virus type 1 disease progression. *J Infect Dis* 180:1106-1115.
178. Greenberg, M., N. Cammack, M. Salgo, and L. Smiley. 2004. HIV fusion and its inhibition in antiretroviral therapy. *Rev Med Virol* 14:321-337.
179. Overbaugh, J., and C.R. Bangham. 2001. Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. *Science* 292:1106-1109.
180. Dragic, T., A. Trkola, D.A. Thompson, E.G. Cormier, F.A. Kajumo, E. Maxwell, S.W. Lin, W. Ying, S.O. Smith, T.P. Sakmar, and J.P. Moore. 2000. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5639-5644.
181. 2004. The state of GPCR research in 2004. *Nat Rev Drug Discov* 3:575, 577-626.

182. Bhattacharya, J., P.J. Peters, and P.R. Clapham. 2003. CD4-independent infection of HIV and SIV: implications for envelope conformation and cell tropism in vivo. *Aids* 17 Suppl 4:S35-43.
183. Edwards, T.G., T.L. Hoffman, F. Baribaud, S. Wyss, C.C. LaBranche, J. Romano, J. Adkinson, M. Sharron, J.A. Hoxie, and R.W. Doms. 2001. Relationships between CD4 independence, neutralization sensitivity, and exposure of a CD4-induced epitope in a human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol* 75:5230-5239.
184. Hoffman, T.L., C.C. LaBranche, W. Zhang, G. Canziani, J. Robinson, I. Chaiken, J.A. Hoxie, and R.W. Doms. 1999. Stable exposure of the coreceptor-binding site in a CD4-independent HIV-1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6359-6364.
185. Vermeire, K., and D. Schols. 2005. Cyclotriazadisulfonamides: promising new CD4-targeted anti-HIV drugs. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 56:270-272.
186. Vermeire, K., K. Princen, S. Hatse, E. De Clercq, K. Dey, T.W. Bell, and D. Schols. 2004. CADA, a novel CD4-targeted HIV inhibitor, is synergistic with various anti-HIV drugs in vitro. *Aids* 18:2115-2125.
187. Vermeire, K., Y. Zhang, K. Princen, S. Hatse, M.F. Samala, K. Dey, H.J. Choi, Y. Ahn, A. Sodoma, R. Snoeck, G. Andrei, E. De Clercq, T.W. Bell, and D. Schols. 2002. CADA inhibits human immunodeficiency virus and human herpesvirus 7 replication by down-modulation of the cellular CD4 receptor. *Virology* 302:342-353.
188. Simmons, G., P.R. Clapham, L. Picard, R.E. Offord, M.M. Rosenkilde, T.W. Schwartz, R. Buser, T.N. Wells, and A.E. Proudfoot. 1997. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* 276:276-279.
189. Mack, M., B. Luckow, P.J. Nelson, J. Cihak, G. Simmons, P.R. Clapham, N. Signoret, M. Marsh, M. Stangassinger, F. Borlat, T.N. Wells, D. Schlondorff, and A.E. Proudfoot. 1998. Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. *J Exp Med* 187:1215-1224.
190. Baba, M., O. Nishimura, N. Kanzaki, M. Okamoto, H. Sawada, Y. Iizawa, M. Shiraishi, Y. Aramaki, K. Okonogi, Y. Ogawa, K. Meguro, and M. Fujino. 1999. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5698-5703.

191. Takashima, K., H. Miyake, R.A. Furuta, J.I. Fujisawa, Y. Iizawa, N. Kanzaki, M. Shiraishi, K. Okonogi, and M. Baba. 2001. Inhibitory effects of small-molecule CCR5 antagonists on human immunodeficiency virus type 1 envelope-mediated membrane fusion and viral replication. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3538-3543.
192. Baba, M., K. Takashima, H. Miyake, N. Kanzaki, K. Teshima, X. Wang, M. Shiraishi, and Y. Iizawa. 2005. TAK-652 inhibits CCR5-mediated human immunodeficiency virus type 1 infection in vitro and has favorable pharmacokinetics in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4584-4591.
193. Takashima, K., H. Miyake, N. Kanzaki, Y. Tagawa, X. Wang, Y. Sugihara, Y. Iizawa, and M. Baba. 2005. Highly potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by TAK-220, an orally bioavailable small-molecule CCR5 antagonist. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3474-3482.
194. Strizki, J.M., C. Tremblay, S. Xu, L. Wojcik, N. Wagner, W. Gonsiorek, R.W. Hipkin, C.C. Chou, C. Pugliese-Sivo, Y. Xiao, J.R. Tagat, K. Cox, T. Priestley, S. Sorota, W. Huang, M. Hirsch, G.R. Reyes, and B.M. Baroudy. 2005. Discovery and characterization of vicriviroc (SCH 417690), a CCR5 antagonist with potent activity against human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4911-4919.
195. Lalezari, J. 2004. 873140, a novel CCR5 antagonist: antiviral activity and safety during short-term monotherapy in HIV-1-infected adults. In 44th Interscience Conference on Antiretroviral Agents and Chemotherapy. Washington.
196. Dorr, P., M. Westby, S. Dobbs, P. Griffin, B. Irvine, M. Macartney, J. Mori, G. Rickett, C. Smith-Burchnell, C. Napier, R. Webster, D. Armour, D. Price, B. Stammen, A. Wood, and M. Perros. 2005. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4721-4732.
197. Westby, M., M. Lewis, J. Whitcomb, M. Youle, A.L. Pozniak, I.T. James, T.M. Jenkins, M. Perros, and E. van der Ryst. 2006. Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. *J Virol* 80:4909-4920.
198. Heveker, N., M. Montes, L. Germeroth, A. Amara, A. Trautmann, M. Alizon, and J. Schneider-Mergener. 1998. Dissociation of the signalling

- and antiviral properties of SDF-1-derived small peptides. *Curr Biol* 8:369-376.
199. Labrosse, B., A. Brelot, N. Heveker, N. Sol, D. Schols, E. De Clercq, and M. Alizon. 1998. Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus coreceptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100. *J Virol* 72:6381-6388.
 200. Schols, D. 2003. Anti-HIV activity profile of AMD070, an orally bioavailable CXCR4 antagonist. In 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston.
 201. Hamdan, F.F., M. Audet, P. Garneau, J. Pelletier, and M. Bouvier. 2005. High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J Biomol Screen* 10:463-475.
 202. Kunkel, H.A., A. Trams, and V. Claudius. 1967. [The mutagenic effect of n-nitroso-n-methyl acetamide in *Drosophila melanogaster*]. *Biophysik* 4:90-91.
 203. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
 204. Kim, F.J., N. Manel, Y. Boublik, J.L. Battini, and M. Sitbon. 2003. Human T-cell leukemia virus type 1 envelope-mediated syncytium formation can be activated in resistant Mammalian cell lines by a carboxy-terminal truncation of the envelope cytoplasmic domain. *J Virol* 77:963-969.
 205. Kitamura, M. 1996. Creation of a reversible on/off system for site-specific in vivo control of exogenous gene activity in the renal glomerulus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7387-7391.
 206. Collman, R., J.W. Balliet, S.A. Gregory, H. Friedman, D.L. Kolson, N. Nathanson, and A. Srinivasan. 1992. An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 66:7517-7521.
 207. Kim, F.M., D.L. Kolson, J.W. Balliet, A. Srinivasan, and R.G. Collman. 1995. V3-independent determinants of macrophage tropism in a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J Virol* 69:1755-1761.
 208. Crise, B., L. Buonocore, and J.K. Rose. 1990. CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. *J Virol* 64:5585-5593.

209. Kim, J.W., and J.M. Cunningham. 1993. N-linked glycosylation of the receptor for murine ecotropic retroviruses is altered in virus-infected cells. *J Biol Chem* 268:16316-16320.
210. Pique, C., C. Lagaudriere-Gesbert, L. Delamarre, A.R. Rosenberg, H. Conjeaud, and M.C. Dokhelar. 2000. Interaction of CD82 tetraspanin proteins with HTLV-1 envelope glycoproteins inhibits cell-to-cell fusion and virus transmission. *Virology* 276:455-465.
211. Lifson, J.D., K.M. Hwang, P.L. Nara, B. Fraser, M. Padgett, N.M. Dunlop, and L.E. Eiden. 1988. Synthetic CD4 peptide derivatives that inhibit HIV infection and cytopathicity. *Science* 241:712-716.
212. Capdepon, S., D. Londos-Gagliardi, M. Joubert, P. Correze, M.E. Lafon, B. Guillemain, and H.J. Fleury. 2005. New insights in HTLV-I phylogeny by sequencing and analyzing the entire envelope gene. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21:28-42.
213. Spear, P.G. 2004. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cellular microbiology* 6:401-410.
214. Montgomery, R.I., M.S. Warner, B.J. Lum, and P.G. Spear. 1996. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87:427-436.
215. Geraghty, R.J., C. Krummenacher, G.H. Cohen, R.J. Eisenberg, and P.G. Spear. 1998. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* 280:1618-1620.
216. Jin, Q., L. Agrawal, Z. Vanhorn-Ali, and G. Alkhatib. 2006. GLUT-1-independent infection of the glioblastoma/astroglioma U87 cells by the human T cell leukemia virus type 1. *Virology* 353:99-110.
217. Tirand, L., C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, E. Trinquet, S. Pinel, M.L. Viriot, F. Guillemin, and M. Barberi-Heyob. 2006. A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release* 111:153-164.
218. Jones, K.S., K. Fugo, C. Petrow-Sadowski, Y. Huang, D.C. Bertolette, I. Lisinski, S.W. Cushman, S. Jacobson, and F.W. Ruscetti. 2006. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *J Virol* 80:8291-8302.
219. Takenouchi, N., K.S. Jones, I. Lisinski, K. Fugo, K. Yao, S.W. Cushman, F.W. Ruscetti, and S. Jacobson. 2007. GLUT1 is not the primary binding receptor but is associated with cell-to-cell transmission of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol* 81:1506-1510.

220. Tamamura, H., A. Omagari, K. Hiramatsu, K. Gotoh, T. Kanamoto, Y. Xu, E. Kodama, M. Matsuoka, T. Hattori, N. Yamamoto, H. Nakashima, A. Otake, and N. Fujii. 2001. Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140. *Bioorg Med Chem Lett* 11:1897-1902.
221. Fassina, G., A. Buffa, R. Benelli, O.E. Varnier, D.M. Noonan, and A. Albini. 2002. Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea as a candidate anti-HIV agent. *Aids* 16:939-941.
222. Kawai, K., N.H. Tsuno, J. Kitayama, Y. Okaji, K. Yazawa, M. Asakage, N. Hori, T. Watanabe, K. Takahashi, and H. Nagawa. 2003. Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenol, binds to CD4 and interferes with gp120 binding. *The Journal of allergy and clinical immunology* 112:951-957.
223. Nakane, H., and K. Ono. 1990. Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases. *Biochemistry* 29:2841-2845.
224. Sonoda, J., C. Koriyama, S. Yamamoto, T. Kozako, H.C. Li, C. Lema, S. Yashiki, T. Fujiyoshi, M. Yoshinaga, Y. Nagata, S. Akiba, T. Takezaki, K. Yamada, and S. Sonoda. 2004. HTLV-1 provirus load in peripheral blood lymphocytes of HTLV-1 carriers is diminished by green tea drinking. *Cancer science* 95:596-601.
225. Li, H.C., S. Yashiki, J. Sonoda, H. Lou, S.K. Ghosh, J.J. Byrnes, C. Lema, T. Fujiyoshi, M. Karasuyama, and S. Sonoda. 2000. Green tea polyphenols induce apoptosis in vitro in peripheral blood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. *Jpn J Cancer Res* 91:34-40.
226. Rao, D.N., B. Ganesh, K.A. Dinshaw, and K.M. Mohandas. 2002. A case-control study of stomach cancer in Mumbai, India. *Int J Cancer* 99:727-731.
227. Setiawan, V.W., Z.F. Zhang, G.P. Yu, Q.Y. Lu, Y.L. Li, M.L. Lu, M.R. Wang, C.H. Guo, S.Z. Yu, R.C. Kurtz, and C.C. Hsieh. 2001. Protective effect of green tea on the risks of chronic gastritis and stomach cancer. *Int J Cancer* 92:600-604.
228. Schuermann D, P.C., Rouzier R, Nougarede R, Faetkenheuer G, Ochlast I, Raffi F, Hoffman C, Greaves W and Sansone A. 2005. SCH 417690: antiviral activity of a potent new CCR5 receptor antagonist. In The 3rd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment. Rio de Janeiro, Brazil.

229. Baba, M., H. Miyake, X. Wang, M. Okamotoand, and K. Takashima. 2006. Isolation and Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistant to the Small-Molecule CCR5 Antagonist TAK-652. *Antimicrob Agents Chemother*
230. Wei, X., J.M. Decker, H. Liu, Z. Zhang, R.B. Arani, J.M. Kilby, M.S. Saag, X. Wu, G.M. Shaw, and J.C. Kappes. 2002. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1896-1905.
231. Lalezari, J.P., E. DeJesus, D.W. Northfelt, G. Richmond, P. Wolfe, R. Haubrich, D. Henry, W. Powderly, S. Becker, M. Thompson, F. Valentine, D. Wright, M. Carlson, S. Riddler, F.F. Haas, R. DeMasi, P.R. Sista, M. Salgo, and J. Delehanty. 2003. A controlled Phase II trial assessing three doses of enfuvirtide (T-20) in combination with abacavir, amprenavir, ritonavir and efavirenz in non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-naive HIV-infected adults. *Antiviral therapy* 8:279-287.

7. ANNEXE

CONTRIBUTIONS

Ghez, D., Y. Lepelletier, S. Lambert, J.M. Fourneau, V. Blot, **S. Janvier**, B. Arnulf, P.M. van Endert, N. Heveker, C. Pique, and O. Hermine. 2006. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol* 80:6844-6854.

Ma contribution pour cet article scientifique a été de m'apercevoir de l'absence de la séquence codant pour le domaine transmembranaire de NRP1 dans le vecteur pSecTagA-NRP1 (ce plasmide, gracieusité d'un autre laboratoire, était jusqu'à ce moment utilisé en le considérant complet). J'ai par la suite « réparé » ce plasmide en utilisant la méthode représentée à la figure 2.3. Nos collaborateurs ont utilisé cette construction afin de mesurer l'impact de l'expression de NRP1 à la surface d'une cellule cible lors de l'infection par les pseudotypes HTLV-1 et HTLV-2 (Figure 3C de l'article Ghez et al. (100)), expérience qui ne peut évidemment aboutir en absence de domaine transmembranaire.

Janvier, S., and N. Heveker. 2005. [Mystery upon the origin for the selection of AIDS-protective CCR5Delta32]. *Med Sci (Paris)* 21 :577-579.

J'ai participé à cet article en tant que co-auteur. J'ai également participé à la recherche bibliographique.